

Institut für Humangenetik  
Medizinische Fakultät  
der  
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Untersuchung zur Mosaik-Trisomie 7 bei atypischen Pigmentnaevi mittels  
Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung am Gewebeschnitt

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES  
DOKTORS DER MEDIZIN

der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2009

vorgelegt von  
Bülent Tayfun Kaplan  
geb. am 06.02.1979 in Adiyaman/Türkei

Für meine Eltern...

Annem ve Babama saygı ve gururla...

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b><u>Einteilung</u></b>	<b>5</b>
2.1.	Thematische Einführung	5
2.2.	Atypische/ Dysplastische Naevi	7
2.3.	Genetische Aspekte bei familiären Fällen von Melanomen bzw. atypischen/ dysplastischen Naevi	9
2.4.	Genetische Veränderungen in Melanomen bzw. atypischen/ dysplastischen Naevi	11
2.5.	Trisomie 7	13
<b>3.</b>	<b><u>Material und Methodik</u></b>	<b>15</b>
3.1.	Gewebeproben	15
3.2.	Bezugsquellen der Materialien	18
3.3.	Lösungen und Puffer	20
3.4.	Silan-Beschichtung der Objektträger	27
3.5.	Verwendete Sonden	27
3.6.	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung	29
3.7.	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung an Paraffin-Schnitten	32
3.7.1.	Vorbehandlung der Schnitte	32
3.7.2.	Denaturierung und Hybridisierung	33
3.7.3.	Stringenzwaschung und Detektion	34
3.8.	Variationen des Protokolls	35
3.9.	Auswertung der Fluoreszenz-Signale	35

<b>4.</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b><u>37</u></b>
4.1.	Ergebnisse der Voruntersuchung	37
4.2.	Ergebnisse der ausgeweiteten Studie	40
4.3.	Informationen zu den einzelnen Präparaten	46
4.4.	Vergleichung der beiden Studien für Ringchromosom-Patienten	48
<b>5.</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b><u>49</u></b>
5.1.	Mosaik-Trisomie 7 in einem hochgradig proliferativen atypischen Naevuszellnaevus bei konstitutionellem Ringchromosom 7	49
5.2.	Mosaik-Trisomie 7 in 32 atypischen Naevi	50
5.3.	Methodische Aspekte	52
5.4.	Bedeutung der Trisomie 7 in Naevuszellen	53
<b>6.</b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b><u>56</u></b>
<b>7.</b>	<b><u>Danksagung</u></b>	<b><u>69</u></b>
<b>8.</b>	<b><u>Lebenslauf</u></b>	<b><u>70</u></b>

**Abkürzungen**

#	Chromosom Nummer
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
A. dest.	Destilliertes Wasser
Anti-K	Antikörper
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin)
ca.	circa
Ca.	Karzinom
CDK	Cyclin- abhängige Kinasen (Cyclin dependent kinases)
CGH	Comparative genomische Hybridisierung
Chr.	Chromosom
CISS	Chromosomaler in situ Suppressionshybridisierung
cm	Zentimeter
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylidol
d.FA	Deionisiertes Formamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ea	Jeweils
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
ISH	In situ Hybridisierung
M	Molar
m	Männlich

---

MM	Master-Mix
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NASCN	Natrium-Thiocyanat
ng	Nanogramm
NIH	National Institutes of Health
NISH	Nicht radioaktive in situ Hybridisierung
Nr.	Nummer
OT	Objektträger
p	Kurzer Arm des Chromosoms
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
q	langer Arm des Chromosoms
r	Korrelationskoeffizient
RA	Rheumatoide Arthritis
rDNA	Ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Sek.	Sekunde
SSC	Natriumchlorid-Citrat-Puffer
Tab.	Tabelle
UV	Ultraviolett
w	Weiblich
WHO	Weltgesundheitsorganisation

## **1. Zusammenfassung**

### **Untersuchung zur Mosaik-Trisomie 7 bei atypischen Pigmentnaevi mittels Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung am Gewebeschnitt**

Atypische oder nach alter Nomenklatur dysplastische Naevi zeigen eine erhöhte Tendenz zur malignen Entartung mit Übergang zum malignen Melanom. Eine prämaligne genetische Veränderung auch bereits in Naevuszellen entsprechender atypischer Naevi erscheint daher möglich. Beim malignen Melanom wurden verschiedene zytogenetische Aberrationen, darunter auch das Auftreten von Zellen mit Trisomie 7 beschrieben. Cytogenetische Abweichungen bei humanen Malignomen beziehen häufig Chromosom 7 mit ein. Das Vorliegen von onkogenetisch relevanten Genen auf dem langen Arm von Chromosom 7 wurde u.a. für Epitheltumore und hämatologische Tumore diskutiert. Es wurde weiterhin vermutet, dass der Gewinn von Chromosom 7 bei malignen Melanomen eine Rolle spielt. In der Voruntersuchung eines Patienten mit Ringchromosom 7 konnten wir in Naevuszellen eines hochproliferativen atypischen Naevus eine Mosaik-Trisomie 7 darstellen.

Durch die vorliegende Arbeit wurde das Auftreten von Trisomie 7 als generelles zytogenetisches Phänomen in prämaligen dysplastischen Naevi überprüft.

Hierzu wurden 32 weitere atypische Naevuspräparate mit Zwei-Farben-Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung für die Chromosomen 7 und 12 an Paraffin-Gewebeschnitten untersucht. Dabei wurde auch ein weiteres atypisches Naevuspräparat des Ringchromosom 7-Patienten einbezogen und vergleichend analysiert.

Bei der Voruntersuchung des hochproliferativen, primär exzidierten Naevus wurde mittels FISH eine Trisomie 7-Rate von 32,1% erhoben, bei dem zweiten Naevus, der im Rahmen der Folgestudie untersucht wurde, wurde ebenfalls eine Mosaik-Trisomie 7 von 6,5% ermittelt.

Bei der zusammenfassenden Analyse der 32 atypischen Naevuspräparate zeigte sich in 65,6% (21 Fälle) eine Trisomie 7 mit prozentualen Anteilen 2-7%. Trisomie 7- Raten unter 2% wurden methodisch bedingt nicht bewertet. Vergleichbar hohe Trisomie-7-Raten wie im Ausgangsfall wurden nicht erfasst.

Zusammenfassend konnte somit in einem hohen Anteil von 65,6% der dysplastischen Nävi eine relevante Mosaik-Trisomie 7 –allerdings mit relativ geringem Mosaikanteil - belegt werden. Unter Berücksichtigung der angewandten Analyse an Schnittpräparaten mit hierdurch bedingter Kerntrunkation ist bei den analysierten Nävi allerdings ein im Vergleich zum FISH-Befund höherer Anteil 7-trisomer Zellen anzunehmen.

In Anbetracht bekannter proliferationsassoziiierter Aspekte einer Polysomie von Chromosom 7 könnten die erhobenen Befunde auf eine grundlegende Bedeutung der Trisomie 7 im Rahmen des Wachstumsverhaltens atypischer Naevi im Sinne einer prämaligen Veränderung hindeuten. Zu einer eindeutigen Bewertung sind weiterführende Analysen zur Prävalenz von Trisomie 7 auch in unauffälligen Pigmentnaevi sowie Untersuchungen an Pigmentnaevi unterschiedlicher Dysplasiegrade erforderlich.



## Summary

### **Examination to mosaic trisomy 7 at atypical pigment naevi by fluorescence in situ hybridisation in tissue sections**

Atypical or –according to former nomenclature- dysplastic naevi show an increased tendency to malignant transformation towards malignant melanoma. Thus, premalignant genetic changes in yet non malignant dysplastic naevus cells may be possible. In malignant melanoma among various cytogenetic alterations trisomy 7 has been described. In human malignancies in general cytogenetic findings frequently include aberrations, involving chromosome 7 giving rise to the hypothesis of oncogenetic relevant genes in the long arm of chromosome 7, specifically discussed for epithelial and haematological tumors. The observed chromosome 7 copy gain therefore has been suspected to play a specific role in malignant melanoma.

In the preliminary investigation of a highly proliferative atypical naevus of a patient with a constitutional ring chromosome 7, we could demonstrate mosaic trisomy 7 in a high percentage of naevus cells. In the presented following study the appearance of trisomy 7 was investigated in further dysplastic naevi to scrutinize a possible general cytogenetic phenomenon in dysplastic naevus cells. For this, paraffin sections of 32 atypical naevus specimens were analysed by two-color- fluorescence- in situ- hybridisation (FISH) using chromosome 7 and 12 (control) specific centromere probes. In this, a further dysplastic naevus specimen of the ring chromosome 7 patient was included and comparatively analysed.

In the preliminary study of the high-proliferative, previously excised naevus a trisomy 7 rate of 32.1% was detected by FISH; in the second naevus of the ring chromosome patient analysed in the following study, mosaic trisomy 7 was found as well, but with a lower rate of 6.5%.

The comprehensive analysis of the 32 dysplastic naevus specimens demonstrated mosaic trisomy 7 of 65.6% (21 cases) showing trisomy 7-rates between 2 and 7%. Trisomy 7 rates below 2% were not evaluated due to methodical limitations of the FISH-technique.

In summary, a mosaic trisomy 7 could be proven in a high portion of about 65.6% of the analysed dysplastic naevi showing relative low mosaic levels, though. With respect to the applied FISH-technique in tissue sections and thus truncated nuclei in the analysed naevus cells compared to the determined FISH-results, higher percentages of mosaic trisomy 7 have to be assumed.

Taking in account knowledge about proliferation associated aspects of polysomy 7, the collected data could indicate a basic relevance of trisomy 7 in atypic naevus cells causing a boosted proliferation in terms of a premalignant transformation. For a definite conclusion, however, further studies regarding the prevalence of trisomy 7 in normal inconspicuous pigmented naevi, as well as analyses in pigmented naevi of different dysplasia grades are needed.

## 2. Einleitung

### 2.1. Thematische Einführung

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und erfüllt vielfältige Funktionen in der Interaktion zwischen Organismus und Umwelt. Sie schützt gegen äußere Umwelteinflüsse wie Kälte, Sonne und Krankheitserreger. Die Haut ist auch ein wichtiges Sinnesorgan, welches das Gehirn ständig mit neuen Informationen über die Umgebung beliefert. Etwa jeder vierte bis sechste Patient in der ärztlichen Praxis leidet mit zunehmender Tendenz an einer Hauterkrankung ([http://www.hautstadt.de/hs/pages/infozentrum\\_haut/hautkrankheiten.php](http://www.hautstadt.de/hs/pages/infozentrum_haut/hautkrankheiten.php)).

Die Begriffswelt der Dermatologie ist in erster Linie durch die Morphologie geprägt, da die Pathophysiologie der überwiegenden Zahl der Hauterkrankungen vor einigen Jahrzehnten noch völlig im Dunkeln lag. Diese Dominanz der Morphologie über die Pathophysiologie konnte erst in den letzten Jahren durch neue molekulargenetische und immunologische Untersuchungen an verschiedenen Hauterkrankungen reduziert werden (DUMMER et al. 1999).

Weltweit zeigte sich in den letzten Jahrzehnten eine deutliche Zunahme von malignen Hauttumoren. Die Inzidenz von Basalzellkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen (auch epitheliale Hauttumore genannt) stieg in Deutschland jährlich von 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner zu Beginn der 70er Jahre auf 55 Neuerkrankungen bei den Frauen und 85 pro 100.000 bei den Männern zu Beginn der 90er Jahre an. Somit sind die epithelialen Hauttumore mit ca. 80.000 Neuerkrankungen die zweithäufigsten Malignome bei beiden Geschlechtern. Die altersstandardisierte Mortalität liegt bei Frauen bei ca. 0,3-0,6 und bei den Männern bei ca. 0,5-0,8/ 100.000 Einwohnern (GARBE et al. 1997).

Maligne Hauttumoren stellen den schwerwiegendsten gesundheitlichen Schaden dar, der, wie ätiologische und epidemiologische Studien absichern, durch UV-Strahlung induziert werden kann (GANDINI et al. 2005).

Die wichtigsten Risikofaktoren für die Melanomentwicklung sind die Anzahl der gewöhnlichen Naevi, die Anzahl der atypischen Naevi sowie die Häufigkeit aktinischer Lentigines. Für Personen mit über 50-60 gewöhnlichen Naevi liess sich ein 16mal erhöhtes Risiko errechnen gegenüber Personen mit nur 10 gewöhnlichen Naevi, und es zeigte sich ein zusätzlich 7mal erhöhtes Risiko für Personen mit einem oder mehreren atypischen Naevi. Die Umwandlung eines atypischen Naevus in ein malignes Melanom wurde in mehreren Berichten photographisch und histologisch dokumentiert. Melanompatienten mit atypischen Naevi haben ein zusätzlich erhöhtes Risiko, ein Zweitmelanom zu entwickeln. Schliesslich sei noch erwähnt, dass Patienten mit atypischen Naevi ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung uvealer Melanome haben (BÖNI et al.1999), (KRUGER et al. 1989, GREEN et al.1989, MARGHOOB et al.1996, HAMMER et al. 1996).

Bei Melanompatienten lassen sich zu 39-56% klinisch atypische Naevi auffinden, während die Häufigkeit in der Normalbevölkerung zwischen 5% und 20%, im Mittel bei 13% liegt. In der Literatur finden sich Hinweise dafür, dass die Anzahl melanozytärer Naevi vererbbar ist: In einer Studie mit monozygoten (eineiigen) und dizygoten (zweieiigen) Zwillingen konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation in der Gesamtzahl der Naevi zwischen monozygoten Zwillingen gefunden werden konnte ( $r=0,83$ ), während bei dizygoten Zwillingen kein Zusammenhang gesehen wurde ( $r=0,24$ ).

Neben den genannten Risikofaktoren stellt natürlich der unterschiedliche Hauttyp (Typen I-VII) eine individuelle Risikosituation für Naevus- und Melanomgenese dar. Zudem nimmt die Inzidenz von Hauttumoren in den letzten Jahrzehnten in der weißen Bevölkerung weltweit stärker zu als die von anderen Krebsarten (ARMSTRONG et al 2001).

## **2.2. Atypische/ Dysplastische Naevi**

Dysplastische melanozytäre Naevi wurden zuerst im Zusammenhang mit familiären malignen Melanomen herausgestellt. Clark und Mitarbeiter beschrieben 1978 diese Assoziation als „B-K-Mole-Syndrom“ (CLARK et al. 1978). Die Buchstaben B und K beziehen sich dabei auf die Namen zweier betroffener Familien. Später wurde erkannt, dass diese ungewöhnlichen Naevi auch bei Einzelpersonen außerhalb von Melanomfamilien vorkommen, und für sie wurde der Begriff „dysplastische melanozytäre Naevi“ vorgeschlagen. Sie stellten damals die Vermutung auf, dass es eine Entwicklungssequenz vom gutartigen Naevus über den dysplastischen Naevus zum Melanom gibt. Das Wort dysplastisch kommt aus der Pathologie und wird außerhalb der Dermatopathologie ausschließlich für die Beschreibung feingeweblicher Veränderungen von Krebs und Krebsvorstufen verwendet. In der wissenschaftlichen Literatur folgte damals ein bis heute andauernder Streit der Gelehrten über diese Hypothese (ACKERMANN et al. 1984, 1991). Es konnte bisher jedoch kein Beweis angeführt werden, der die Behauptung von Clark belegt. Es mag dysplastische Naevi geben, aus denen sich ein Melanom entwickeln würde, diese sind aber weder dermatoskopisch noch durch den Pathologen sich zu identifizieren und sie stellen mit Sicherheit eine sehr kleine Minderheit der heute als dysplastisch diagnostizierten Naevi dar (ROESCH. et al. 2006). Eine vom NIH 1992 zusammengerufene Expertenkonferenz setzte sich mit dem inzwischen unter Kritik geratenen Begriff des dysplastischen Naevus auseinander (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE 1992). Sie schlug vor, den Begriff des dysplastischen melanozytären Naevus zu verlassen und stattdessen den Begriff des atypischen melanozytären Naevus und des „Syndroms atypischer Naevi“ einzuführen.

Vom „familiären Syndrom atypischer Naevi“ sind klassischerweise mehrere Familienmitglieder, bei denen auch schon Melanome entstanden sind, betroffen. Diese Patienten haben ein ausgesprochen hohes Risiko (CAREY et al. 1994, GREENE et al. 1985), im Alter zwischen 20 und 60 Jahren das erste maligne Melanom zu entwickeln; oft treten auch mehrere Melanome bei demselben Patienten auf. Im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ist das Risiko um etwa das Fünfhundertfache erhöht.

Interessanterweise entwickeln nur diejenigen Familienangehörigen in Melanomfamilien maligne Melanome, die das Syndrom atypischer Naevi ausprägen. Bei Familienangehörigen ohne Syndrom atypischer Naevi wurde kein erhöhtes Melanomrisiko beobachtet.

Zu den klinischen Merkmalen atypischer Naevi gehören Kriterien der sogenannten ABCDE-Regel, die auch für das maligne Melanom zutreffen:

A Symmetrie/Asymmetrie des Aufbaus

B Begrenzung (scharf/unscharf)

C Colorit (homogen/inhomogen)

D Durchmesser (>5mm)

E Evolution (Wachstum im Erwachsenenalter)

Die Summation der Kriterien ergibt eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines atypischen Naevus oder auch für ein malignes Melanom. Zur differentialdiagnostischen Abklärung sollte die Dermatoskopie herangezogen werden. Wie eine Metaanalyse von 22 Studien mit 9004 pigmentierten Hautläsionen zeigt, erreichen Experten im Vergleich zu klinischen Diagnostik mit der Dermatoskopie einen 35%igen Anstieg der diagnostischen Treffsicherheit und damit eine Sensitivität von 89% und eine Spezifität von 79% (KITTLER et al. 2002). Bei der Beurteilung melanozytärer Hautläsionen ist eine Verlaufsbeobachtung mit der computergestützten Dermatoskopie wertvoll (KITTLER et al. 2000), (FRIEDMANN 1985& CRUTCHER 1986).

Aufgrund epidemiologischer Daten lässt sich errechnen, dass innerhalb der kaukasischen Bevölkerung jährlich 1 von 3000 atypischen Naevuszellnaevi in ein Melanom übergeht (SEYKORA et al.1996). In der Literatur finden sich Hinweise dafür, dass die Anzahl melanozytärer Naevi vererbbar ist (EASTON et al.1991). Das relative Risiko eines Individuums, atypische Naevi zu entwickeln, errechnet sich auf 7,2, wenn einer oder mehrere Verwandte ersten Grades atypische Naevi aufwiesen (TUCKER et al.1993). Das Risiko für Verwandte von Individuen mit atypischen

Naevi, selbst atypische Naevi zu entwickeln, ist gegenüber der Normalbevölkerung etwa 4mal erhöht (CRIJNS et al. 1991).

Die Neuentstehung der Naevi unter Immunsuppression ist in der Literatur dokumentiert (BÖNI et al. 1995, TUCKER et al. 1985, GROB et al. 1996). Die Ursachen der Ausbildung von Naevi unter Immunsuppression sind noch weitgehend unklar. Denkbar wäre aber ein durch die Immunsuppression induzierter Defekt oder Funktionsverlust von sogenannten "charakter"-Genen (für die Aufrechterhaltung des Genoms verantwortliche Gene, beispielsweise Nukleotid-Exzisions-Reparaturgene) (KINZLER et al. 1997).

Aufgrund der von Mendel beschriebenen Vererbungsgesetze wurde bei vielen menschlichen Merkmalen zunächst ein monogener Erbmechanismus vermutet. Alternativ zur Hypothese eines autosomal dominanten Erbgangs mit inkompletter Penetranz (LYNCH et al. 1983) wird für das Syndrom der dysplastischen Naevi jedoch das Konzept der polygenen Vererbung diskutiert (HAPPLE 1989). Auf der Basis genetischer Untersuchungen mikrodissasierter aggregierter Naevozyten atypischer Naevi wiesen verschiedene Studien darauf hin, dass sich bei klinisch und/oder histologisch atypischen/dysplastischen Naevi genetische Veränderungen nachweisen lassen, wie sie auch beim malignen Melanom vorkommen (WANG et al. 1996, LEE et al. 1997, PARK et al. 1998).

### **2.3. Genetische Aspekte bei familiären Fällen von Melanomen bzw. atypischen/ dysplastischen Naevi**

Abgesehen von den oben genannten familiären Häufungen für melanozytische Naevi bzw. dysplastische Naevi sprechen weitere genetische Aspekte für eine erbliche oder genetische Beteiligung. Beim malignen Melanom der Haut wie auch bei vielen anderen soliden Tumoren ist die maligne Transformation der Zellen und die Progression der Tumoren Folge einer Kaskade von genetischen Veränderungen. Kopplungsanalysen in Melanomfamilien legen nahe, dass neben dem nur in

Einzelfällen veränderten CDK4-Gen zwei weitere bislang nicht identifizierte Melanomgene existieren, die in den Chromosomenabschnitten 1p36 und 9p21 lokalisiert sind. Neuere Daten weisen darauf hin, dass das p16-(CDKN2)-Tumorsuppressorgen die frühe Progression bei zumindest einigen Melanomen steuert. Eine Assoziation mit bestimmten Varianten des Melanocortin-1-Rezeptors führt zu einer weiteren Risikoerhöhung. Die Ausschaltung von noch nicht bekannten Genen auf den Chromosomenarmen 6q, 10p und 10q scheint ebenfalls eine pathogenetische Rolle in frühen Melanomstadien zu haben. Bislang war es aber noch nicht möglich, diese genetischen Veränderungen mit bestimmten morphologischen Stadien des primären Melanoms zu assoziieren. Entsprechend den Befunden bei anderen Tumorarten scheint der Verlust von genetischem Material der Chromosomenbanden 1p36 und 11q23 - 25 ebenso wie die Amplifikation von Abschnitten des Chromosoms 7 mit einem erhöhten Metastasierungspotenzial verbunden zu sein (WEIß et al. 2002). Bereits 1989 fanden Bale und Mitarbeiter bei Familien mit dem klassischen dysplastischen Naevussyndrom (BK-Mole-Syndrom) Hinweise, dass eine Assoziation mit einem Abschnitt auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p36) besteht (BALE et al. 1989). Die Untersuchung von Melanomfamilien in anderen Regionen konnte diesen Befund jedoch nicht bestätigen (GRUIS et al. 1993, GOLDSTEIN et al. 1994, CANNON-ALBRIGHT et al. 1990). In späteren Untersuchungen wurde eine Assoziation mit 1p36 nur in Familien gefunden, die zusätzlich multiple atypische Naevi aufwiesen. Es wird deshalb angenommen, dass in diesem Chromosomenabschnitt ein Gen für die Ausbildung dysplastischer Naevi lokalisiert sein könnte. Bei einzelnen Melanomfamilien war jedoch eine ausschließliche Kopplung des Erbgangs mit 1p36 nachweisbar, so dass in diesem Bereich sehr wahrscheinlich auch ein initiales Melanomgen lokalisiert sein dürfte (GOLDSTEIN et al. 1993). Bislang war es aber nicht möglich, die Lokalisation des gesuchten Melanom-/dysplastischen Naevusgens weiter einzuengen. Untersuchungen weltweit bestätigten, dass bei der Mehrzahl der Melanomfamilien, unabhängig davon, ob bei diesen Familien das Melanom in Assoziation mit dysplastischen Naevi auftrat, eine genetische Kopplung des Auftretens eines Melanoms mit diesem Chromosomenabschnitt nachweisbar war (GRUIS et al. 1993 & GOLDSTEIN et al. 1994).



#### **2.4. Genetische Veränderungen in Melanomen bzw. atypischen/dysplastischen Naevi**

Im Rahmen der Tumorigenese bzw. vermehrten Zellproliferation treten in der Regel z. T. primäre, z. T. sekundäre genetische Veränderungen in den betroffenen Zellen auf.

In (Tumor)zytogenetischen Studien wurden v.a. bei Melanomen, in geringem Umfang auch bei dysplastischen/atypischen Naevi, Chromosomenaberrationen analysiert.

Cytogenetische Abweichungen in der menschlichen Malignität beziehen häufig Chromosom 7 mit ein. Das Bestehen einiger Tumor-Störgene auf dem langen Arm von Chromosom 7 ist in den Epithel- und hämatologischen Tumoren vorgeschlagen worden (HASLE et al. 1998). Die häufigsten numerischen Änderungen wurden in Chromosomen 6, 7, 9 und 10 gesehen. Gewinn des Chromosoms 6 und 7 und/oder Verluste von Chromosom 9 und 10 kann eine wichtige Rolle in Tumorigenese und in der Entwicklung der bösartigen Melanome spielen (MATSUTA et al. 1997).

Durch die Erkennung familiärer Formen des malignen Melanoms und die molekularbiologische Erarbeitung von genetischen Markern wissen wir heute, dass bei einigen Familien ein Gen auf Chromosom 1 liegt, das für Melanomerkkrankungen prädisponiert, bei anderen zum Beispiel auf Chromosom 9. Die Identifizierung und Charakterisierung dieser "Melanogene" ist zwar noch nicht vollständig, jedoch werden mehrere Kandidatengene sehr intensiv untersucht. Weitere chromosomale Regionen, in denen wichtige Gene für die Transformation und Progression von Melanomen vermutet werden, finden sich auf den Chromosomen 6, 7, und 10; eine erhöhte Amplifikation von bestimmten Genregionen der Chromosomen 5, 11 und 22 beim akrolentiginösen Melanom konnte gezeigt werden (BREUNINGER et al. 1994). Verlust der Region 9p21, 6q, 10q und Gewinn von Chromosom 7 sind die häufigsten chromosomalen Abweichungen, die in den menschlichen Melanomen gefunden werden, aber es sind sehr wenige cytogenetische Daten vorhanden, die dysplastische Naevi betrachten (RÁKOSY et al. 2007). Eine besondere klinische Ausprägung und eine ungewöhnliche cerebelläre Metastasierung in Uveal-Melanomen wurde in Zusammenhang mit dem Auftreten von Monosomie-7 beobachtet (TAYLAN et al. 2007). Ein Ringchromosom 7 wurde bei einem 8 Jahre alten Jungen gefunden, der

aufgrund von Kleinwuchs und Gesichtsdysmorphien zytogenetisch untersucht wurde. Er hatte fast weiße Haare, Café-au-lait-Flecken und viele schwarze atypische pigmentierte Naevi (WAHLSTRÖM et al. 1996). Auch bei wenigen weiteren bislang publizierten Fällen von konstitutionellem Ringchromosom 7 wurde eine auffällige Häufung von multiplen Pigmentnaevi als charakteristisches Phänomen beschrieben, was einen ursächlichen Bezug dieser speziellen Chromosomenanomalie zu der Entstehung von Pigmentnaevi nahe legt. Bei konstitutionellen Ringchromosomen sind somatische Gewinne oder Verluste des strukturell veränderten Chromosoms häufig. Eine numerische Aberration von Chromosom 7 in auffällig proliferativen Naevuszellen wäre in diesen Fällen daher grundsätzlich denkbar. Dies ist insbesondere von Interesse, da auch in verschiedenen genetischen Studien zum sporadischen malignen Melanom numerische Abweichungen (i.d.R. Zugewinn) von Chromosom 7 als ursächliche chromosomale Veränderung diskutiert wurden (VOLLENWEIDER ROTEN et al. 1993).

Es gibt auch Hinweise, dass eine Überexpression des EGFR-Gens (lokalisiert in 7q) eine wichtige Rolle bei der Metastasierung des malignen Melanoms spielen könnte. Dieses wird durch die Beobachtung von Polysomie 7, welche mit entsprechend erhöhter EGFR Gen-Kopien-Zahl einhergeht, reflektiert (UDART et al. 2001).

Eigene Voruntersuchungen bei einem 14-jährigen Patienten, der multiple, z.T. auffällige congenitale Naevi aufwies, konnten einen bedeutenden Gewinn von Chromosom 7 innerhalb eines stark aktivierten, congenitalen melanozytären Naevus darstellen.

Dadurch kamen wir zur der Frage, ob eine Zugewinn z.B. eine Trisomie von Chromosom 7 auch bei sporadischen dysplastischen/atypischen Naevi ein generelles zytogenetisches Ereignis darstellen kann.

## **2.5. Trisomie 7**

Beim Menschen ist eine konstitutionelle Trisomie des Chromosoms 7 mit der Entwicklung eines lebensfähigen Organismus nicht vereinbar. In der Regel führt eine durch meiotische Fehlverteilung bereits in der Zygote vorhandene Trisomie 7 zur frühembryonalen Entwicklungsstörung und endet mit einer frühen Fehlgeburt (YUNIS et al., 1980). In seltenen Fällen kann aus einer Trisomie 7 infolge eines sogenannten trisomic rescue eine uniparentale Disomie 7 ggf. mit dem klinischen Bild eines Silver-Russel-Syndroms entstehen (KOTZOT et al., 2000). Konstitutionelle chromosomale Mosaik- mit einer Trisomie-7-Zelllinie sind bei neugeborenen Menschen bei geringem Trisomie-7-Mosaikanteil grundsätzlich möglich und in seltenen Einzelfällen mit phänotypischen Auffälligkeiten beschrieben (VERP et al., 1987; KAYSER et al., 2000; MEHRAEIN et al., 2004).

Ein angeborenes Vorliegen einer Trisomie 7 wird kaum beobachtet, aber eine Mosaik-Trisomie 7 ist als somatische Mutation ein wiederholt und in verschiedenen Konditionen beobachtetes Phänomen (JOHANSSON et al., 1993; MITELMAN et al., 2001). Der Entstehungsmodus somatischer Mosaik-Trisomie 7 entweder als Folge mitotischer Fehlverteilung oder durch selektive Endoreduplikation des Chromosoms 7 ist bislang ungeklärt (STAHL-MAUGE et al., 1978; TAKANAI et al., 1991). Die Mosaik-Trisomie 7 wurde primär als zytogenetisches Charakteristikum verschiedener maligner Tumore (z.B. Hirntumore wie maligne Gliome, Nierenzell-, Blasen-, Kolon-, Lungen-, Schilddrüsen-, Ovarial-Karzinome u.a.) aber auch benigner Tumore (z.B. Kolon-Adenome) beschrieben (REY et al., 1987; LIMON et al., 1990; BERROZPE et al., 1990; HERRMANN & LALLEY et al., 1992; HERBERGS et al., 1994; PYLKKÄNEN et al., 1995; DUBINSKY et al., 1995; GBUREK et al., 1997; AMALFITANO et al., 2000; MERTENS et al., 2000; MITELMAN et al., 2001). Seminome und nichtseminomatöse Tumoren zeigen charakteristische Chromosomen-Aberrationen: Zugewinne auf den Chromosomen 7. Die Analyse der gemischten Keimzelltumoren zeigen identische chromosomale Aberrationen innerhalb der einzelnen histologischen Kompartimente (KLEINE et al., 2005). Bei Mamma-Ca fanden sich für die Chromosomen 1, 7, 8, 18 und 20 gehäuft Trisomien, die sowohl

isoliert als auch im Rahmen komplexer Mutationen des Chromosomensatzes auftraten (PANDIS et al. 1995, HEIM et al. 1993, BULLERDIEK et al. 1993). Weiterhin konnte auch in einer Reihe nicht-maligner, überwiegend chronisch entzündlicher, bindegewebig proliferativer Störungen eine Mosaik-Trisomie 7 beobachtet werden. So wurden Chromosom-7-trisomie Zellen im betroffenen Gewebe von Glomerulonephritis, pigmentierter villonodulöser Synovitis, Dupuytren'scher Kontraktur, bei Karpaltunnel-Syndrom und in atherosklerotischen Plaques gefunden (FLETCHER et al., 1992; DAL CIN et al., 1999; MATTURRI et al., 2000); von Ermis et al. konnte erstmals das Auftreten von Mosaik-Trisomie 7 in RA-Synovia beschrieben werden (ERMIS et al., 1993). Aufgrund der Beobachtung auch in scheinbar normalen Geweben wie z.B. Gehirn oder Niere (meist jedoch angrenzend zu reseziertem Tumormaterial) ist die Wertigkeit der Trisomie 7 in Bezug auf die genannten Krankheitskonditionen bzw. Tumore jedoch fraglich (LEE et al., 1987; KOVACS & BRUSA et al. 1989; HEIM et al., 1989; ELFVING et al. 1992; JOHANSSON et al., 1993; NAEEM et al., 1993 KNUUTILA et al., 1995). Neueste, teils metaanalytisch erhobene Daten von soliden Tumoren sowie Synovia bei juveniler chronischer Arthritis führten zu der Hypothese, dass das somatische Auftreten der Trisomie 7 ein im höheren Lebensalter auftretendes, rein altersabhängiges Epiphänomen darstellen könnte (BROBERG et al., 2001).

Numerische chromosomale Aberrationen sind als somatische Ereignisse überwiegend aus Tumoren bekannt. Auch die Trisomie 7 wurde primär bei einer Reihe von Tumorerkrankungen beschrieben. In gutartigen Astrozytomen und in Glioblastomen des Gehirns wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen als genetisch frühe chromosomale Veränderung eine zunächst fokale, dann zunehmende Trisomie und Polysomie 7 als charakteristisch gesehen (PYLKKANEN et al., 1995; STEILENGIMBEL et al., 1996; AMALFITANO et al., 2000). Das gleiche gilt für papilläre Nierenadenome und –Karzinome (LIMON et al., 2000). Eine progressionsauslösende Wirkung dieser Chromosomenanomalie wird diskutiert (LOEPERS et al., 2001; JUNG et al. 2001).

### **3. Material**

#### **3.1. Gewebeproben**

Im Vorversuch wurde ein stark proliferativer atypischer Pigmentnaevus eines Patienten mit konstitutionellem Ringchromosom 7 (Karyotyp: 46,XY,r(7)) im histologischen Schnittpräparat analysiert; dieser wurde bei klinischem Verdacht auf das Vorliegen eines malignen Melanoms exzidiert.

In der ausgeweiteten Folgestudie wurden die histologischen Präparate von 32 klinisch atypischen Pigmentnaevi von 32 Patienten, die zum Ausschluss eines Melanomverdachtes in der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes operiert wurden. Nach der histologischen Befundung handelte es sich bei 20 Gewebeproben um dysplastische Compoundnaevi, darunter war eine weitere Gewebeprobe des o.g. Patienten mit bekannter Ringchromosom 7 Anomalie (Fallnummer 1). 7 Gewebeproben waren dysplastische Junktionsnaevi und bei 4 Gewebeproben handelte es sich um dysplastischen Naevi mit Zeichen der Regression. Irrtümlicherweise wurde eine Gewebeprobe mit einer seborrhoischen Keratose vom retikulären Typ (Basalzellpapillom) (Fallnummer 3) in der Naevusgruppe mituntersucht.

Die 32 Gewebeproben stammten von 23 männlichen und 9 weiblichen Patienten. Der jüngste Patient war mit 14 Jahren Fallnummer 1, der einen dysplastischen Junktionsnaevus hatte. Der älteste Patient war mit 76 Jahren Fallnummer 23, der einen Compoundnaevus zeigte. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 49,2 Jahre. Im Rahmen der Routinehistologie wurden die Gewebeproben als Paraffin-Schnitte behandelt und aufbewahrt.

**Informationen der Gewebeproben**

Fall Nr.	Gewebe Nr.	Histologische Diagnose	Geschlecht	Alter
1	1816/06	Dysplastischer Compoundnaevus	M	14
2	4279/06	Dysplastischer Compoundnaevus	M	45
3	3195/06	Seborrhoische Keratose vom retikulären Typ	W	68
4	3225/06	Dysplastischer Compoundnaevus	M	35
5	3141/06	Dysplastischer Compoundnaevus	M	63
6	2401/06	Dysplastischer Compoundnaevus	M	64
7	1793/06	Dysplastischer Compoundnaevus	M	23
8	113/06	Dysplastischer Junktionsnaevus mit Regression	M	19
9	2239/06	Dysplastischer Naevus	M	42
10	2279/06	Dysplastischer Compoundnaevus	M	24
11	2008/06	Dysplastischer Compoundnaevus	M	49
12	1115/06	Dysplastischer Compoundnaevus	M	46
13	187/06	Dysplastischer Naevus	W	62
14	138/06	Dysplastischer Junktionsnaevus	M	70

15	939/06	Dysplastischer Junktionsnaevus	M	52
16	562/04	Dysplastischer Compoundnaevus	M	69
17	1737/04	Dysplastischer Compoundnaevus	W	48
18	2641/02	Dysplastischer Compoundnaevus	M	63
19	1678/03	Dysplastischer Compoundnaevus	M	32
20	2138/02	Dysplastischer Compoundnaevus	W	38
21	1945/04	Dysplastischer Junktionsnaevus mit Regression	M	61
22	2139/02	Dysplastischer Compoundnaevus	w	38
23	623/05	Dysplastischer Compoundnaevus mit Regressionszone	M	76
24	1403/05	Dysplastischer Naevus mit Regression	M	42
25	1289/05	Dysplastischer Junktionsnaevus	W	50
26	367/05	Dysplastischer Junktionsnaevus mit Regressionszone	W	56
27	892/05	Dysplastischer Compoundnaevus	M	48

28	2639/02	Dysplastischer Compoundnaevus	M	63
29	3137/06	Dysplastischer Naevuszellnaevus	M	72
30	3543/04	Dysplastischer Junktionsnaevus mit Regression	W	52
31	797/04	Dysplastischer Compoundnaevus	W	38
32	2851/02	Dysplastischer Compoundnaevus	M	59

Die jeweiligen Gewebeproben wurden nach Exzision routinemäßig Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet. Für die in situ Hybridisierung wurden 5µm-Dicke Schnitte angefertigt und auf Silan-beschichtete Objektträger aufgezogen. Als Referenzpräparat wurde von jedem Präparat ein Parallel-Schnitt in Hämotoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

### **3.2. Bezugsquellen der Materialien**

Antifade:	VECTOR
Biotin-Nick-Translation Mix:	ROCHE
BSA:	ROTH
Cot 1:	ROCHE
Ethanol:	ROTH
Fixogum:	MARABU
Formaldehyd:	MERCK



---

Goat-anti-Mouse Ig/Cy3:	DIANOVA
Goat-anti-streptavidin-Biotin:	VECTOR
HCL:	MERCK
Heringssperma-DNA:	PROMEGA
Isopropanol:	FLUKA
Maus-AK-Cy3:	DIANOVA
Paraformaldehyd:	MERCK
Pepsin:	MERCK
PBS:	INVITROGEN
Silan:	FLUKA
Strept-AVIDIN-FITC:	VECTOR
Tween 20:	SIGMA
Xylol:	MERCK

### **3.3. Lösungen und Puffer**

Hier sind die benutzten Lösungen angegeben. Die Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> unter möglichst reinen Bedingungen angesetzt.

#### **3% BSA/4xSSC/0,1% Tween20**

Für 10ml:

BSA wird vorher in SSC eingeweicht bei 4°C

2mL 20xSSC + 8ml A.dest + 0,3g BSA + 100µl Tween 20

#### **1% BSA/4xSSC/0,1% Tween20**

Für 10ml:

BSA wird vorher in SSC eingeweicht bei 4°C

2mL 20xSSC + 8ml A.dest + 0,1g BSA + 100µl Tween 20

#### **DAPI (Diamidinophenylindol) Stocklösung**

Sigma D-1388

Merck 2465

200µg/ml A.dest. → gelöst und bei 4°C gelagert.

Für DAPI-Reagenz → 120µl DAPI/ 100ml 2xSSC

#### **Deionisiertes Formamid**

- 5-10 g Austauscherharz/ 100ml Formamid
- 0,5-1,5 h auf dem Magnetrührer rühren

- Anschließend mit einem doppelten Faltenfilter abfiltrieren
- pH auf 7,0 einstellen

**50% FA/2xSSC**

50% deionisiertes Formamid/2xSSC      pH 7,0

Für 100 ml:      50 ml d. FA  
                         +  
                         10 ml 20x SSC  
                         +  
                         40 ml A. dest.  
100ml → pH auf 7,0 mit HCl einstellen

**70% FA/2xSSC**

70% deionisiertes Formamid/2xSSC      pH 7,0

Für 100 ml:      70 ml d. FA  
                         +  
                         10 ml 20x SSC  
                         +  
                         20 ml A. dest.  
100ml → pH auf 7,0 mit HCl einstellen

**0,9% NaCl pH 2,0**

1000 ml ansetzen

- 1000 mL A. dest. + 9 g NaCl
- Gut mischen und bei pH-Meter mit HCL auf pH 2,0 einstellen

**Mastermix 2.1**

angesetzt im Falcon-tube (innen steril)

Grundrezept:	3-fache Menge benötigt:
5,5 ml Formamid deionisiert	16,5 ml Formamid deionisiert
1 g Dextransulfat	3 g Dextransulfat
0,5 ml 20 x SSC	1,5 ml 20 x SSC

- stark vortexen
- 70°C einige Stunden zum Lösen des Dextransulfats (Falcon im Wasserbad)
- Kühlen auf RT
- pH einstellen auf 7,0 - vorsichtig! titrieren mit 1 N HCl
- Volumen mit A. dest. steril auf  $3 \times 7 = 21$  ml einstellen

**1M NaSCN (Natrium-Thiocyanat)-Lösung**

Fluka 71938

1 M = 81,07 g NaSCN/l A.dest. → einmischen und autoklavieren

**PBS-Stocklösung 1M (20 x PBS)**

- 1) 29,25g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \times \text{H}_2\text{O}$  (Di-Natriumhydrogen-phosphat-Dihydrat)  
Merck-Nr.: 6580
- 2) 4,9g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kaliumdihydrogenphosphat) M = 136,09g  
Merck-Nr.: 4873
- 3) 160g NaCl (Natriumchlorid)  
Merck-Nr.: 6404

auf 1000ml Aqua dest. auffüllen.

- 1) und 2) lösen, dann 3) zugeben.
- pH auf 7,2 einstellen
- auf 1000ml voll auffüllen
- autoklavieren

### **PBS-Arbeitslösung 0,05M (1xPBS)**

Stammlösung auf 1:20 verdünnen.

z.B.: 50 ml Stammlösung mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen.

→ 1l 0,05M PBS

### **1xPBS / 4% PFA**

$$4\% = 40 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \quad \text{Gewichtsprozent} = \text{weight/volume}$$

(PFA = Paraformaldehyd)

200ml 1xPBS:        -        10 ml 20xPBS (Stocklösung)  
                             - 190ml H<sub>2</sub>O dest.

+ 8g PFA

bei 60°C im Wasserbad lösen!

ACHTUNG: PFA ist atemwegsreizend!

- 
- nicht umschütten, nur mit Spatel
  - für Wasserbad ein Gefäß mit Deckel benutzen (Dämpfe)
  - Lösung erst verwenden, wenn abgekühlt (Dämpfe)

**10xPBS / 0,1% PFA**

$$0,1\% = 1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \quad \text{Gewichtsprozent} = \text{weight/volume}$$

(PFA = Paraformaldehyd)

200ml 10xPBS:    -100ml 20xPBS (Stocklösung)

                      - 100ml H<sub>2</sub>O dest.

+ 0,2g PFA

bei 60°C im Wasserbad lösen!

**20% Pepsin-Stocklösung**

- Anstaz 10 ml
- 1g Pepsin/ 5ml A.dest
- 2g Pepsin / 10ml A.dest

**3% Pepsin-Stocklösung**

- Anstaz 10 ml
- 3% Pepsin in A. dest.
- 30mg Pepsin/ml A. dest → 300mg Pepsin in 10 ml A.dest lösen

**0,4% Pepsin in 0,2 N HCl**

Für 50 mL:

10 ml 1 N HCl + 40 ml A. dest = 50 mL 0,2 N HCl

49 ml 0,2 N HCl + 1ml 20% Pepsin = 50 ml 0,4% Pepsin

**20 x SSC**

- 3 M NaCl + 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat auf 1l

$$M_{(\text{Tri-Natriumcitrat-Dihydrat})} = 294,1 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$\rightarrow m(\text{für 1l}) = 88,23\text{g (0,3 M)}$$

$$M_{(\text{NaCl})} = 58,44 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$\rightarrow m(\text{für 1l}) = 175,32\text{g (3 M)}$$

- pH einstellen auf 7,0

**2 x SSC**

500 ml ansetzen

20 x SSC 1:10 verdünnen

$$1/10 \times 500 \text{ ml } 20 \text{ x SSC} = 50 \text{ ml } 20 \text{ x SSC}$$

auf 500 ml mit A. dest. auffüllen

$$\rightarrow 500 \text{ ml } 2 \text{ x SSC}$$

**2 x SSC/0.1% Tween20**

500 ml ansetzen

- 20 x SSC 1:10 verdünnen

$$1/10 \times 500 \text{ ml } 20 \text{ x SSC} = 50 \text{ ml } 20 \text{ x SSC}$$

- auf 500 ml mit A. dest. auffüllen

$$\rightarrow 500 \text{ ml } 2 \text{ x SSC}$$

- 0,1 % Tween 20:  $\frac{100\mu l}{100ml} = \frac{500\mu l}{500ml}$

- rühren!

#### **4 x SSC/0.1 % Tween20**

500 ml ansetzen

- 20 x SSC 1:5 verdünnen

$$1/5 \times 500 \text{ ml } 20 \times \text{SSC} = 100 \text{ ml } 20 \times \text{SSC}$$

- auf 500 ml mit A. dest. auffüllen

→ 500 ml 4 x SSC

- 0,1 % Tween 20:  $\frac{100\mu l}{100ml} = \frac{500\mu l}{500ml}$

- rühren!



### 3. Methodik

#### 3.4. Silan-Beschichtung der Objektträger

Zu besseren Präparatanhaftung wurden die Glasobjektträger mit Silan beschichtet. Nach zweimaliger Vorinkubation in Chloroform (je zehn Minuten; RT) wurden die Objektträger luftgetrocknet. Anschließend erfolgte die Silanisierung in 5% Silan in Aceton für fünf Minuten (RT), gefolgt von einer Waschreihe in 2mal Aceton und Aqua dest. (je 10 Sek.) . Die Objektträger wurden anschließend bei RT staubfrei luftgetrocknet und gelagert.

Die Gewebeschnitte wurden in der Dermatologischen Klinik am Mikrotom angefertigt (siehe Material).

#### 3.5. Verwendete Sonden

Es wurden nichtkommerzielle Alpha-Satellit-DNA-Sonden verwendet. Die in Plasmide klonierte DNA wurde in Bakterien vermehrt und anschließend durch Plasmidextraktion gewonnen.

Neben einer Chromosom 7-spezifischen DNA-Sonde wurden verschiedene Kontroll-Sonden (Alpha-Satellit-DNA für die Chromosomen 8, 10, 12 und 18) zur Kohybridisierung eingesetzt. Nach Testung in Vorversuchen wurde für die Studie weitgehend die Chromosom 12-Kontrollsonde verwendet.

- |   |                                |                        |
|---|--------------------------------|------------------------|
| - | #7 Centromer-DNA → Digoxigenin | Klon: pa771            |
| - | #8 Centromer-DNA → Digoxigenin | D8Z2 Klon: ATCC 59904  |
| - | #10 Centromer-DNA → Biotin     | D10Z1 Klon: ATCC 61396 |
| - | #12 Centromer-DNA → Biotin     | D12Z1 Klon: ATCC 61398 |
| - | #18 Centromer-DNA → Biotin     | D18Z1 (L1.84): ATCC    |

**DNA-Konzentration der Sonden**

#7:	840 µg/ml Stocklösung	→ 1µg = 1,2 µl
#8:	130 µg/ml Stocklösung	→ 1µg = 7,7 µl
#10:	435 µg/ml Stocklösung	→ 1µg = 2,3 µl
#12:	600 µg/ml Stocklösung	→ 1µg = 1,7 µl
#18:	180 µg/ml Stocklösung	→ 1µg = 5,7 µl

**Sondenmarkierung mittels Biotin- bzw. Digoxigenin-Nicktranslation**

Bio-Nicktranslationskit bzw. Digoxigenin-Nicktranslationskit. Markierung nach Herstellerangaben:

Nicktranslation; **Ansatz:** Die Sonde wird jeweils mit A. dest. steril auf 16 µl aufgefüllt. Dann werden je 4 µl Dig- bzw. Bio-Nick-Mix zugegeben. Jeweils wird 1µg Sonden-DNA markiert.

- Enzyme auf Eis pipettieren, mischen, bei 15°C, 90 min (Kühlwasserbad)
- Reaktionsstop: nach 10 min bei 65°C Wasserbad

**- Fällungsreaktion (Enzyminaktivierung):**

je Tube 20 µl mit 1 µg DNA

- 1 µl COT1-DNA zugeben, Konz. 10 µg/µl
- + 1 µl Heringssperma-DNA, Konz. 10 µg/µl
- 22 µl

**Prinzip:** DNA fällt bei hoher Salzkonzentration in Ethanol aus.

- 1/10 des Volumens (22 µl) 3M Na-acetat pH 5,2 zugeben (Salz) = 2,2 µl
- + 2,2 x des resultierenden Volumens (24,2 µl) 96% Ethanol, bei -20°C vorgekühlt.
- = 53,24 µl
- bei -20°C über Nacht (mind. 2h)

- Zentrifugieren in Kühlzentrifuge, 13.000 Umdrehungen, bei 4°C, 15 min (vorkühlen bei 400 Umdrehungen/min, ca. 10 min)
  - DNA-Pellet
- Überstand ausrinnen lassen
- Waschen mit 70% Ethanol 200-300 µl pro Tube, bei -20°C
- zentrifugieren in Kühlzentrifuge, 5 min
- vorsichtig dekantieren (abgießen)
- Pellet trocknen:
  - in Speed-vac (Vakuum-Zentrifuge), 10 min
  - oder: stehend bei 37°C im Wärmeschrank: umgekehrt stehen lassen → Tropfen kann nicht zurücklaufen
- resuspendieren in 50 µl A. dest. steril
  - Endkonzentration der markierten Stocklösung:  $20 \frac{ng}{\mu l}$

### **3.6. Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung**

Die in situ Hybridisierung (ISH) ist eine Technik, die es ermöglicht, spezifische Nukleinsäuresequenzen in einem Zellpräparat sichtbar zu machen. Bei der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) können mittels fluoreszenz-markierter DNA-Sonden Gen- oder Chromosomenabnormalitäten entdeckt bzw. bestätigt werden, die über die klassische Zytogenetik (Chromosomenanalyse) nicht erfassbar sind (<http://www.mta-verband.at/zytogenetikforum/theorie/fish.htm>).

Die in situ Hybridisierung (ISH) wurde von GALL und PARDUE (1969) und JOHN et al. (1969) unabhängig voneinander entwickelt. Die in situ Hybridisierung (ISH) ist eine aussagekräftige Methode mit vielfältigen Anwendungsgebieten in der Molekularzytogenetik. Ihre Einführung stellt einen großen Fortschritt gegenüber der klassischen Tumorzytogenetik dar (Gall & Padue, 1969, John et al., 1969). Während anfänglich nur repetitive Sequenzen dargestellt werden, gelang Harper und Saunders (1981) die erfolgreiche In situ Hybridisierung einer Einzelkopiesequenz. In der molekularen Genetik stellt die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung ein wichtiges Markierungsverfahren dar, das für viele Untersuchungen benutzt wird. So kann man

mit Hilfe der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung die Anzahl, Lage und Aktivität von Genen studieren oder auch gesamte Chromosomen mittels chromosomaler in situ Suppressions [CISS-] Hybridisierung markieren (Cremer T. 1988, Lichter 1988). Sie beruht darauf, dass sich ein Doppelstrang aus zwei DNA-Molekülen mit komplementären Sequenzen in seine Einzelstränge trennen lässt (Denaturierung) und diese unter entsprechenden Bedingungen wieder einen Doppelstrang ausbilden können (Renaturierung), ohne dass die Moleküle dabei zerstört werden. Wenn man daher zusätzlich markierte DNA-Moleküle (Sonde bzw. Sonden-DNA) hinzu gibt, die komplementär zu bestimmten Sequenzen des Doppelstranges sind (Ziel-Sequenz oder Ziel-DNA), entstehen bei der Renaturierung Hybrid-Moleküle (Hybridisierung), von denen jeweils ein Strang markiert ist. Bei der ISH erfolgt die Hybridisierung nicht an isolierten DNA-Molekülen, sondern in situ, d.h. direkt im cytologischen Präparat an den Stellen, wo die Ziel-DNA vorliegt. Durch den Nachweis der Markierung auf der Sonden-DNA (Detektion) lassen sich die Orte der Hybridisierung sichtbar machen. Als die ISH 1969 entwickelt wurde, konnte als Sonden-DNA nur die gesamte DNA eines Zellkerns oder repetitive Sequenzen wie Satelliten-DNA bzw. rDNA eingesetzt werden. Erst als es Mitte der 70er Jahre durch die Rekombinante DNA-Technologie möglich wurde, DNA-Fragmente zu klonieren, eröffnete sich für die ISH ein breites Spektrum an verschiedenen DNA-Sequenzen, die als Sonde eingesetzt werden konnten. Die Markierung der Sonden-DNA erfolgte anfangs mit radioaktiven Isotopen und die Detektion durch Autoradiographie. Nachteile der radioaktiven Markierung und Autoradiographie sind: 1) lange Expositionszeiten für die Detektion der Markierung von Wochen bis Monaten 2) große Streuung der Signale und 3) der Umgang mit Radioaktivität.

In jüngster Zeit wird daher zunehmend versucht, die radioaktive ISH durch ihre nichtradioaktiven Varianten (NISH) zu ersetzen. Bei ihnen werden keine radioaktiven Isotope zur Markierung verwendet, sondern Reporter-Moleküle, die an einzelne Basen der Sonden-DNA gekoppelt und über ein passendes Detektionssystem nachgewiesen werden. Die Detektion mit Enzymen, die eine Farbreaktion katalysieren bzw. bei der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) mit Fluorochromen, sind mittlerweile die am meisten verbreiteten Systeme geworden. Sie bieten gegenüber der radioaktiven

ISH erhebliche Vorteile: 1) kurze Detektionszeiten von wenigen Stunden bis wenigen Tagen 2) größere Auflösung und Genauigkeit der Lokalisation und 3) keine Radioaktivität (Lichter&Ward, 1990, Lichter et al. 1991, McNiel et al., 1991, Trask, 1991). Ein besonderer Vorteil der FISH gegenüber der radioaktiven ISH ist, dass sich mehrere und verschieden markierte Sonden in einem Präparat gleichzeitig nachweisen lassen (Schmidt, 1992).

Ein Nachteil der nichtradioaktiven ISH war ihre anfangs geringe Sensitivität. Es ließen sich nur DNA-Sequenzen mit einer Länge von einigen 10.000 Basen detektieren, während durch die radioaktive ISH weniger als 2000 Basen nachweisbar waren. Doch die Sensitivität der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung hat sich inzwischen, zumindest an Chromosomen des Menschen, bis auf 500 Basen verbessern lassen (Lemieux, 1992). Sowohl die praktische Durchführung als auch das Auflösungsvermögen wurde durch den Einsatz einer direkten (Bauman et al. 1980) bzw. indirekten (Pinkel et al. 1986) Fluoreszenzmarkierung verbessert. Dabei werden die Fluorochrome durch kurzwelliges monochromatisches Licht zu längerwelliger blauer, grüner, gelber oder roter Fluoreszenzstrahlung angeregt. Diese Technik erlaubt zudem die gleichzeitige Verwendung mehrerer DNA-Sonden, wodurch mehrere Aberrationsereignisse in Kernen, auf Metaphase-Chromosomen oder in Gewebeschnitten, z.B. von Tumoren, gleichzeitig sichtbar gemacht werden können.

Die Standardprotokolle zu Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung sehen einen Formamidgehalt von 40-60% vor, um die Denaturierungstemperatur zu senken und um die Hybridisierungsbedingungen zwischen den verschiedenen Basen zu nivellieren.

Die Zugabe von Formamid ist aber nicht unbedingt nötig, da die chromosomale DNA auch durch reines Erhitzen denaturiert und anschließend in wässriger Lösung hybridisiert werden kann (Celeda 1992). Diese formamidfreie Hybridisierung hat den großen Vorteil, dass Sonden- und Ziel-DNA viel schneller rekombinieren können.

Die Hybridisierungszeit verkürzt sich dadurch von 12-14 auf 1 bis 2 Stunden (Haar 1994). Aufgrund dieser Verkürzung der Hybridisierungszeit wird diese Hybridisierungsvariante Fast-FISH genannt. Ein weiterer Vorteil formamidfreier Hybridisierungen liegt in der Möglichkeit, während der Rekombination die

Temperatur zu erhöhen, was sowohl die Geschwindigkeit als auch die Spezifität der Rekombination erhöht (Durm 1996). Bei Anwesenheit von Formamid ist eine solche Temperaturerhöhung während der Hybridisierung nur sehr eingeschränkt möglich, da dieses organische Lösungsmittel einen starken destabilisierenden Einfluss auf die Doppelstränge hat und oberhalb einer Temperatur von 50°C keine Rekombination mehr stattfinden kann (Marmur 1961).

Die RNA-RNA-Hybridisierung (Cox et al. 1984) und der Nachweis viraler Sequenzen (Orth et al. 1971) sind weitere Anwendungsgebiete der In situ Hybridisierung.

Eine Weiterentwicklung der Technik stellt auch die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) dar (Kallioniemi et al., 1992, 1993, 1994, du Manoir et al. 1993). Bei dieser Methode werden unterschiedlich markierte Tumor-DNA und Kontroll-DNA im Verhältnis 1:1 auf normale Metaphase hybridisiert. Mit Hilfe bildverarbeitender Software lassen sich dann die Chromosomenabschnitte detektieren, in denen das Verhältnis von Tumor-DNA zu Normal-DNA quantitativ voneinander abweicht.

### **3.7. Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung an Paraffin-Schnitten**

Bei dieser entwickelten Methode müssen die Biotin- und Digoxigenin-markierten Sonden und die Detektionssysteme sowohl durch das Gewebe, als auch durch die Membranen in die Zellkerne gelangen. Diese müssen dafür permeabel gemacht werden und es resultieren unterschiedliche Verdauzeiten für verschiedene Gewebe. Diese Methode der In situ-Hybridisierung wurde auf die eingesetzten Sonden, auf das Naevusgewebe optimiert.

#### **Durchführung:**

##### **3.7.1. Vorbehandlung der Schnitte**

Um die Paraffinschnitte zu entparaffinieren werden die Objektträger zuerst bei RT 3x10 min in Xylol, nachfolgend 1x5 min in Isopropanol inkubiert, danach werden sie

2x5 min in 96% Ethanol gewaschen. Anschließend werden sie auf der Heizplatte bei 42°C 2 min lang getrocknet. Die trockenen Schnitte werden in der 0,2 N HCL bei RT 10 min lang inkubiert. Nach der Inkubation werden die Schnitte in A. dest 3min bei RT umgepuffert. Nach der Umpufferung kommen die Schnitte in 1M NaSCN bei 80°C 10 min lang hinein und werden einschließlich 1 min in A.dest und 2x5 min in 2xSSC bei RT umgepuffert. Zum Ende der Umpufferung werden die Schnitte in 0,06% Pepsin/0,9% NaCl pH 2,0 bei 37°C 15 min verdaut. Nach der Verdauung werden sie 2x5 min in 2xSSC bei RT gewaschen und danach auf der Heizplatte bei 42°C 2 min getrocknet. Die trockenen Schnitte kommen bei RT für 10 min in 4%PFA/PBS hinein. Als nächstes werden die Schnitte wieder in 2xSSC 2x5 min gewaschen und auf der Heizplatte bei 42°C 2 min getrocknet.

### 3.7.2. Denaturierung und Hybridisierung

Die Schnitte werden bei 72-73°C in 70% FA/2xSSC pH 6,5 10 min lang denaturiert. Nach der Denaturierung werden die Schnitte nach aufsteigender Alkoholreihe (70-80-96 %) bei 4°C ea 2 min dehydriert. Nach der Alkoholreihe kommen die Schnitte in die Luftkammer zum Lufttrocknen.

Das Sondengemisch enthält 7µl MM 2.1 + 1µl Cot1+ 1µl Chr.7+ 1µl Chr.12 (je nach Protokoll kommt statt Chr.12 entweder Chr.8, Chr.10 oder Chr.18 als Kontroll-Sonde). Das Sondengemisch wird im Reaktionsgefäß bei 75°C 10 min im Wasserbad denaturiert.

Nach dem Lufttrocknen der Schnitte und nach der Denaturierung der Sonde kommt jeweils 10µl Sonde auf die Schnitte. Mit einem 24x24 mm<sup>2</sup> Deckglas wird nach Sondenzugabe die Schnitte abgedeckt und mit Fixogum versiegelt. Die Schnitte werden in einem feuchten Behälter bei 80°C 90 min lang im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation bleiben die Schnitte bei 37°C 24-36 h lang in dem Wärmeschrank.

### 3.7.3. Stringenzwaschung und Detektion

Im Folgenden sind die Detektionen im Falle einer Doppelmarkierung dargestellt. Sowohl die FITC-Signale der Biotin-Markierung als auch die Cy3-Signale der Digoxigenin-Markierung werden amplifiziert.

Es gilt zu beachten, dass alle Waschschritte unter ständigem Schütteln durchgeführt werden.

#### **Durchführung:**

Das Fixogum wird zuerst mit der Pinzette entfernt. Um die Gewebeschnitte nicht mitzureißen, kommen sie in 2xSSC hinein bis die Deckgläser sich von selbst vom OT lösen. Danach kommen die Schnitte für 2x20 min bei 43°C in 50%FA/2xSSC pH 6,5 und einschließlich für 2x10 min bei 43°C in 2xSSC/0,1%Tween 20 hinein. Die Umpufferung erfolgt in 4xSSC/0,1%Tween 20 bei RT 5 min lang.

Ab jetzt muss lichtgeschützt gearbeitet werden, weil jetzt lichtempfindliche Reagenzien zur Verfügung stehen. Proteinblockung erfolgt mit 3% BSA/4xSSC/0,1% Tween 20 15 min lang bei RT. Detektion des Biotin-Signals mit Streptavidin-FITC erfolgt in 1%BSA/4xSSC/0,1%Tween 20 1h lang bei 37°C. Nach der Detektion wird es in 4xSSC/0,1%Tween 20 3x5 min bei 37°C umgepuffert. Detektion des Digoxigenin-Signals mit Anti-Dig-Cy3 und Amplifikation des Biotin-Signals mit Bio-anti-Streptavidin erfolgt in 1%BSA/4xSSC/0,1%Tween20 30 min bei 37°C. Es wird wieder mit 4xSSC/0,1%Tween20 3x5 min bei 37°C umgepuffert. Es wird noch mal mit Maus-Anti-K-Cy3 und Strept-AVIDIN-FITC in 1%BSA/4xSSC/0,1%Tween20 30 min bei 37°C detektiert. Nach der Detektion wird zuerst mit 4xSSC/0,1% Tween20 3x5 min bei 37°C und danach mit 2xSSC 5min bei RT umgepuffert. Für die Gegenfärbung kommen die Schnitte in 120ng DAPI/ ml 2xSSC für 5 min bei RT hinein. Die Umpufferung erfolgt mit A. dest und Lufttrocknen in Luftkammer. Am Ende kommen Antifade und Deckglas auf die Gewebeschnitte und werden lichtgeschützt aufbewahrt.



### **3.8. Variationen des Protokolls**

Um eine möglichst gute Hybridisierungseffizienz zu erzielen, wurde das FISH-Protokoll für einzelne Präparate modifiziert.

Für die Präparate 3543/04

3137/06

2639/02

2851/02

797/04

892/06 wurde das Protokoll so geändert, dass die Präparate mit 0,4% Pepsin in 0,2 N HCl behandelt. Es wurde auf die 90 min. Inkubation bei 80°C verzichtet.

Für das Präparat 3225/06 wurde mit 0,4 %Pepsin in 0,2 N HCl und 0,1%PFA/PBS behandelt und auf die 90 Minute bei 80 °C wurde verzichtet. Die Hybridisierung war deutlich besser als zuvor. Die Ergebnisse wurden durch die präparatbezogenen Modifikationen jeweils hinsichtlich der Hybridisierungseffizienz verbessert.

### **3.9. Auswertung der Fluoreszenz-Signale**

Die Auswertung erfolgte an einem Olympus AX70 Fluoreszenz Mikroskop, welches sowohl mit den Filtern MWIG für DAPI (360-370nm), MWIBA für FITC-Signale (460-490nm) und MWIG für Cy3-Signale(520-550nm) als auch einem Simultanfilter MF für FITC- und Cy3-Signale (480-500/550-575nm) ausgerüstet ist.

Es wurde eine Auswertung der FISH-Analyse gezielt in Naevuszellen des jeweiligen Präparates durchgeführt. Das Analyse-Areal wurde dabei anhand histologischer Vergleichsbewertung eines HE-gefärbten Parallelschnittes ausgewählt. Pro Präparat wurde ein Minimum von 200 Naevus-Zellkernen hinsichtlich der Anzahl Chromosomen-spezifischer Fluoreszenzsignale ausgewertet.

Die Auswertung erfolgte anhand der Kriterien von Hopman et al., 1988.

Es wurden nur Zellkerne ausgewertet, die nicht überlappten und die scharf begrenzte, klar erkennbare Umrisse zeigten. Die Signale mussten hell und punktförmig erscheinen. Da die Zellkerne dreidimensionale Körper sind, d.h. auch eine Tiefe besitzen, war es wichtig mit der Mikrometerschraube zu justieren, um alle Signale in einem Zellkern zu erkennen.

Die ausgewerteten Areale wurden in 10x und 60x Vergrößerung fotografiert und dazu noch Informationen der Objektträger mit dokumentiert.

## 4. Ergebnisse

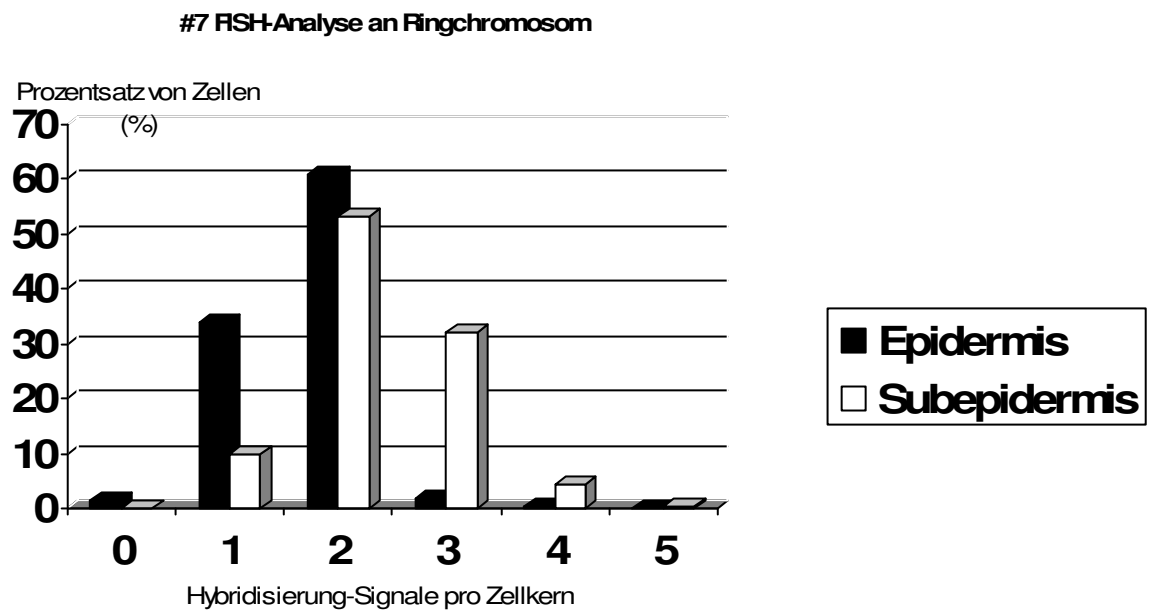
### 4.1. Ergebnisse der Voruntersuchung

Bei der Voruntersuchung handelt es sich um melanozytäre Tumore eines männlichen Patienten, das erste Kind gesunder Eltern. Die Geburt erfolgte wegen Plazenta praevia (fötaler Dystrophie) in der 36. SSW durch Sectio caesarea. Im Verlauf zeigte sich eine Wachstumsverlangsamung und Mikrozephalie. Einige dysmorphe Eigenschaften einschließlich Fehlbildung der Akren, tiefer sitzende Ohren, hoch gewölbter Gaumen sowie Skelett- und Gliedentstellung, z.B. angelegte Daumen und Klinodaktylie. Die Haut zeigte einen großen Naevus flammeus an der Stirn und mehrfache kleine flache kongenitale melanozytäre Naevi mit dunklerer Pigmentation an der Rückseite hauptsächlich im spinalen Bereich. Die Größe und das Gewicht lagen unterhalb des 3. Perzentils. In der Haut befanden sich über 120 melanozytäre 0,3-3 cm durchmessende Naevi. Wegen Dysplasie und erhöhten Wachstumstendenz wurde ein melanozytärer Naevus von 2,5x2cm<sup>2</sup> chirurgisch von der Fußsohle entfernt. Die histomorphologische Analyse deckte einen kongenitalen melanozytären Hautnaevus auf, der kein Zeichen von Malignität aufwies.

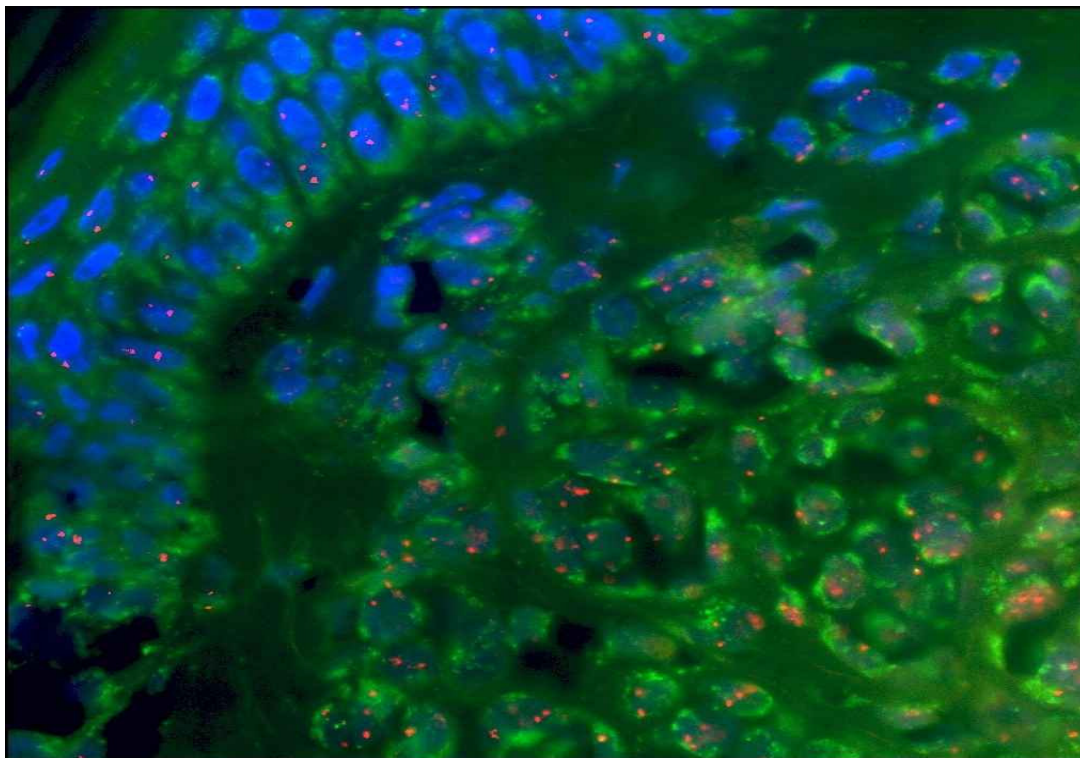
Die Chromosomenanalyse mittels Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung wurde in kongenitalen melanozytären Naevusgewebe (MCN) mit Chromosom- 7- Alpha-Satellit durchgeführt. Die Signale für Chromosom 7 wurden in 200 Zellen in epidermal/ junctional und subepidermal/ dermalen Bereich untersucht.

In 61% der intraepidermal/ junctional Zellen zeigten sich 2 Centromersignale für Chromosom 7, in 34% nur ein Signal und in 2% wurden drei Signale gekennzeichnet, nur ein Kern (0,5%) zeigte vier Signale, in 1,5% der Zellen wurden keine Signale beobachtet. So wurden mehr als zwei Signale, die einen Gewinn des Materials des Chromosoms 7 aufwiesen, in 2,5% von intraepidermalen Zellen ermittelt.

Im subepidermal/dermalen Bereich wiesen 53,1% der Zellen zwei Hybridisierungssignale Chromosom 7 auf. In 32,1% drei, in 4,3% vier und in 0,5% fünf spezifische Chromosom 7- Signale auf. In 10% der Zellen wurde nur ein Signal beobachtet und Kein- Signal wurde nicht ermittelt (siehe Diagramm 1).

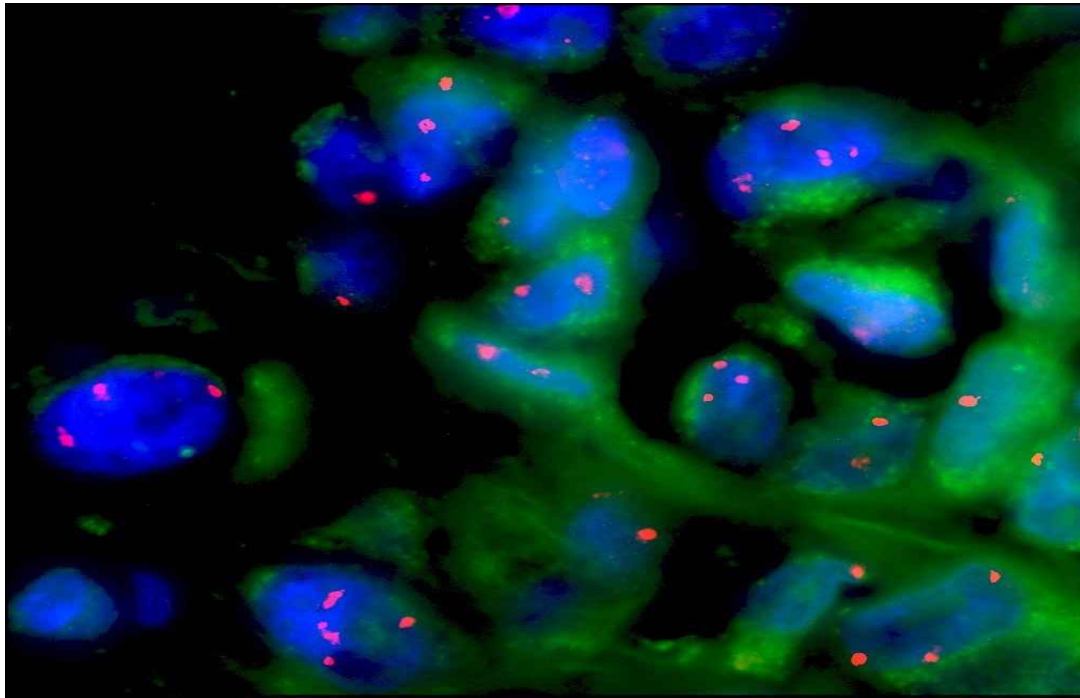


**Diagramm 1**



**Abb. 1**

Simultane Darstellung von #7 (Cy3-markiert, rot) und #12 (FITC-markiert, grün) am Naevus-Gewebeschnitt mit Ringchromosom (10er Objektiv).



**Abb. 2**

Simultane Darstellung von #7 (Cy3-markiert, rot) und #12 (FITC-markiert, grün) am Naevus-Gewebeschnitt mit Ringchromosom (100er Objektiv).

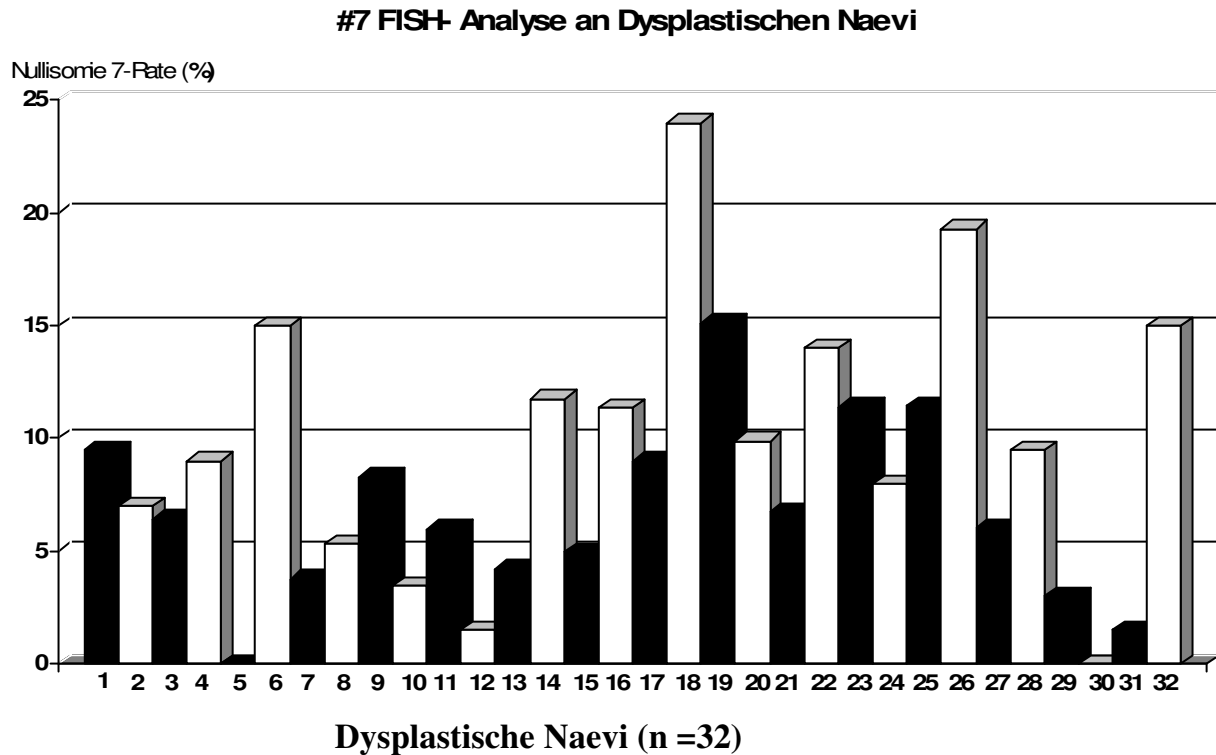


**Abb. 3:** Patient mit Ringchromosom

#### **4.2. Ergebnisse der ausgeweiteten Studie**

Die ausgeweitete Studie bezieht sich auf die FISH- Analyse an 32 dysplastischen Naevi. Die Präparate wurden mit Chr.7 und Chr.12 (als Kontrollsonde) markiert. Bei den Auswertungen wurden Nullisomie, Monosomie, Disomie und Trisomie für die jeweilige Sonde beobachtet. Bei FISH-Analysen an Gewebeschnitten wird durch die Trunkierung von Zellkernen typischerweise nicht in allen Zellen der in-vivo bestehende Chromosomengehalt erfasst. Die chromosomale Grundkonstitution lässt sich daher nicht in der Einzelzelle sondern am Gesamtbild des Signalverteilungsmusters ableiten. Um methodisch bedingte falsch-positive Fehlbewertung zu vermeiden, wird bei der indirekten FISH-Analyse bei numerischen Fragestellungen ein sog. cut-off-Level eingeführt, oberhalb dessen ein chromosomaler Zugewinn als relevant zu bewerten ist. Für die hier dargestellte Analyse wurde der für Lymphozyten-FISH-Analysen ermittelte cut-off-Level von 2% zur Erfassung einer Trisomie übernommen.

Bei der Auswertung haben in 32 ausgewählten dysplastischen Naevi analysierte Zellkerne entsprechend Diagramm 2 durchschnittlich 8,5% negative Chr.7- Signale (Nullisomie 7) gezeigt. Die höchste Nullisomierate für Chr.7 wies Fall 18 mit 24% auf. Ein Ausbleiben von Nullisomie zeigte sich in den Fällen 5 und 30. Bei der Kontrollsonde für Chr.12 haben die analysierten Zellkerne durchschnittlich 37% negative Chr.12-Signale (Nullisomie 12) gezeigt. Die höchste Nullisomierate für Chr.12 wies Fall 28 mit 57,5% auf, Fall 3 zeigte die niedrigste Nullisomierate mit 9,4%. Ein Ausbleiben von Nullisomie 12 zeigte sich in keinem Fall. In der Auswertung gab es keine relevanten Ausreißer, so dass an dem FISH- Protokoll eine Modifikation nicht erforderlich war.

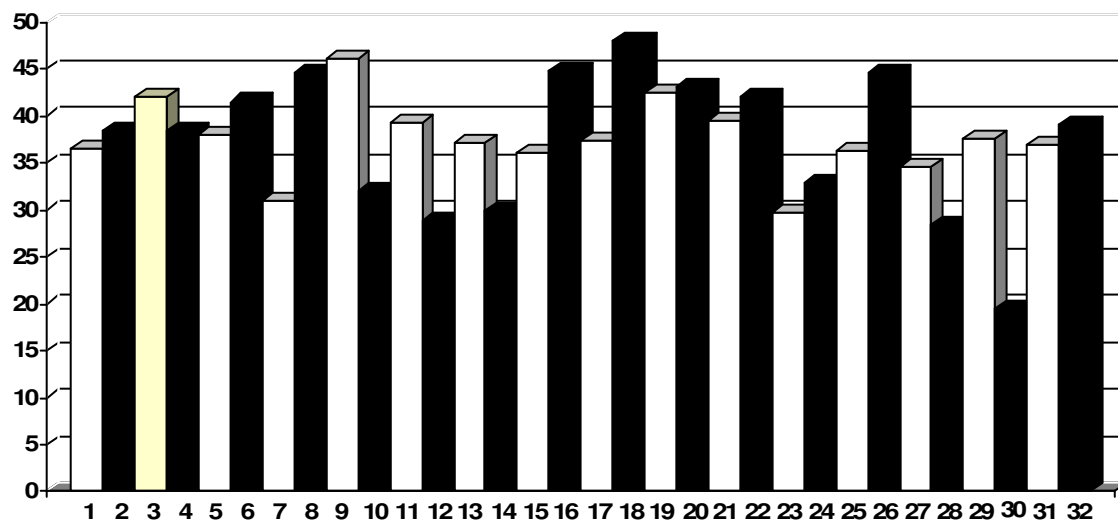


**Diagramm 2**

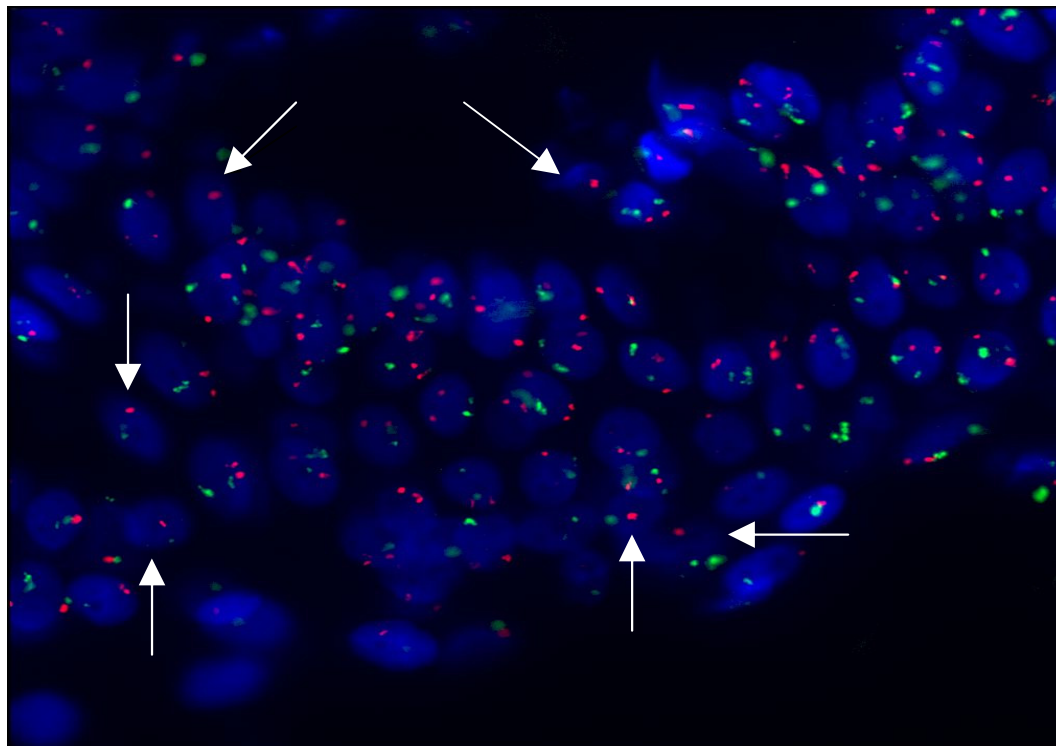
Bei der Auswertung der Naevuspräparate bezüglich Chromosom 7 haben durchschnittlich 37% der Zellkerne nur ein Chr.7-Signal (Monosomie) gezeigt (siehe Diagramm 3). Hierbei wies Fall 18 mit 48% die höchste Monosomierate, Fall 30 mit 19,5% die niedrigste. Bei der Kontrollsonde für Chr.12 haben durchschnittlich 35,2% der Zellkerne nur ein Chr.12-Signal (Monosomie) gezeigt. Dabei wies Fall 12 mit 45,3% die höchste Monosomierate, Fall 27 mit 12% die niedrigste.

Monosomie 7-Rate (%)

## #7 FISH-Analyse an Dysplastischen Naevi



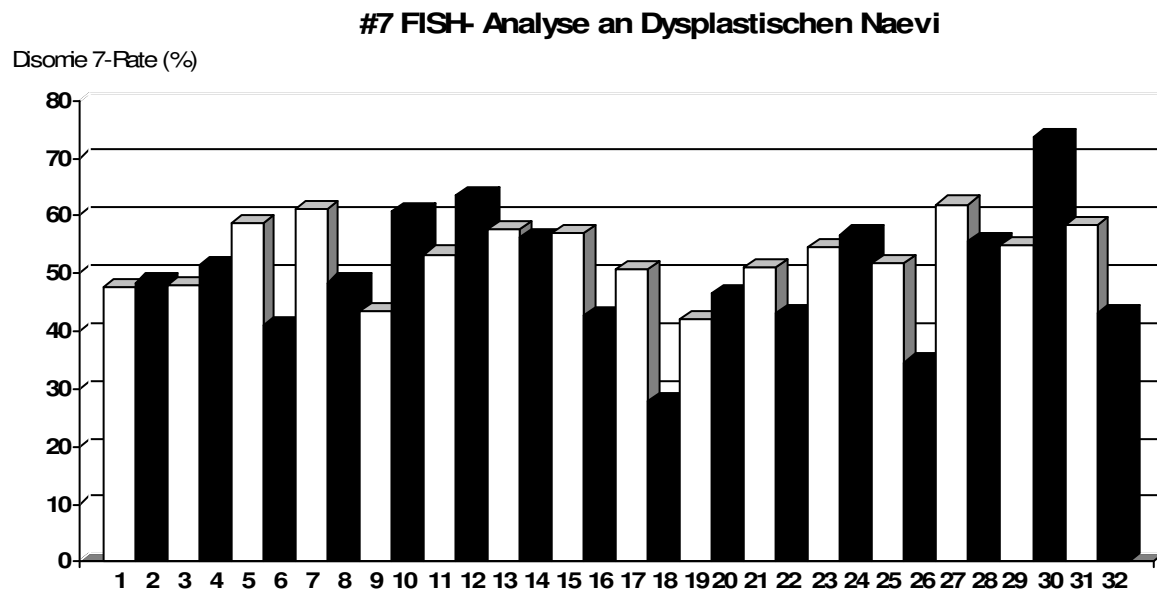
Dysplastische Naevi (n =32)

Diagramm 3Abb. 4

Simultane Darstellung von #7 (Cy3-markiert, rot) und #12 (FITC-markiert, grün) am dysplastischen Naevus-Gewebeschnitt. Es liegen Beispiele von Kernen mit Monosomie 7(→) (40er Objektiv).

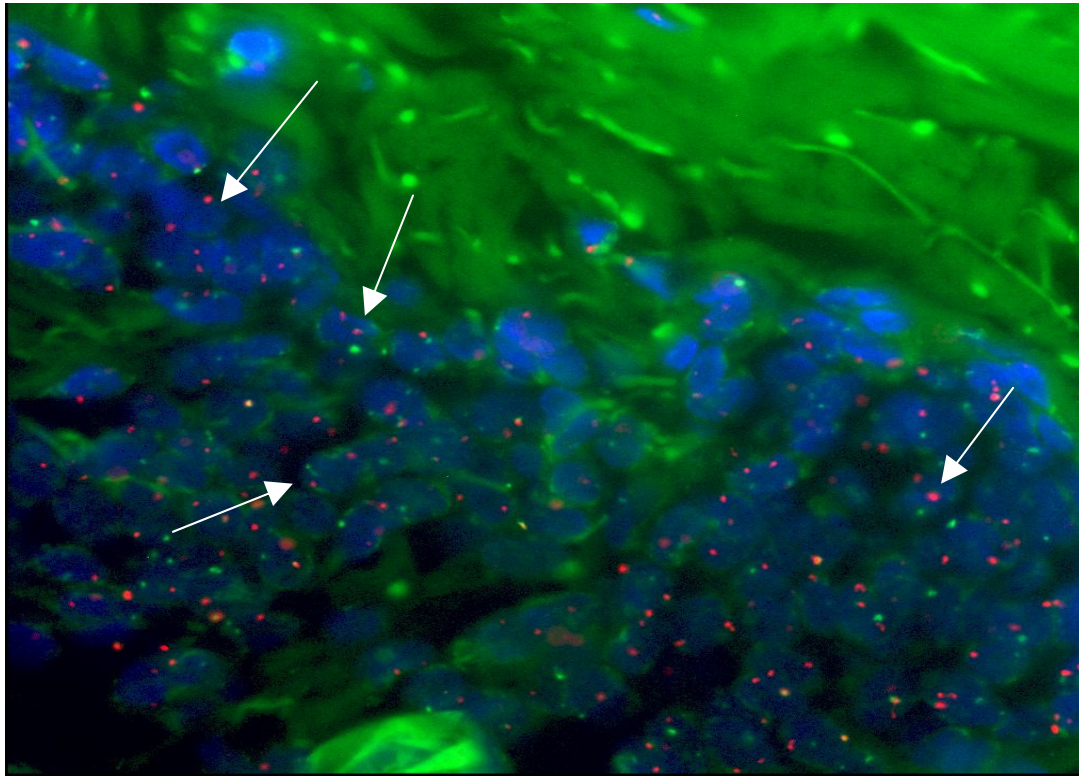


Durchschnittlich haben 51% der Zellkerne der 32 Naevuspräparate zwei Chr.7-Signale (Disomie) gezeigt (siehe Diagramm 4). Das höchste Signal wies Fall 30 mit 73,5% und das niedrigste Fall 18 mit 28% auf. Bei der Kontrollsonde für Chr.12 haben durchschnittlich 26,7% der Zellkerne zwei Chr.12-Signale (Disomie) gezeigt. Hierbei wies Fall 3 mit 50% die höchste Disomierate, Fall 11 mit 13,4% die niedrigste.



Dysplastische Naevi (n =32)

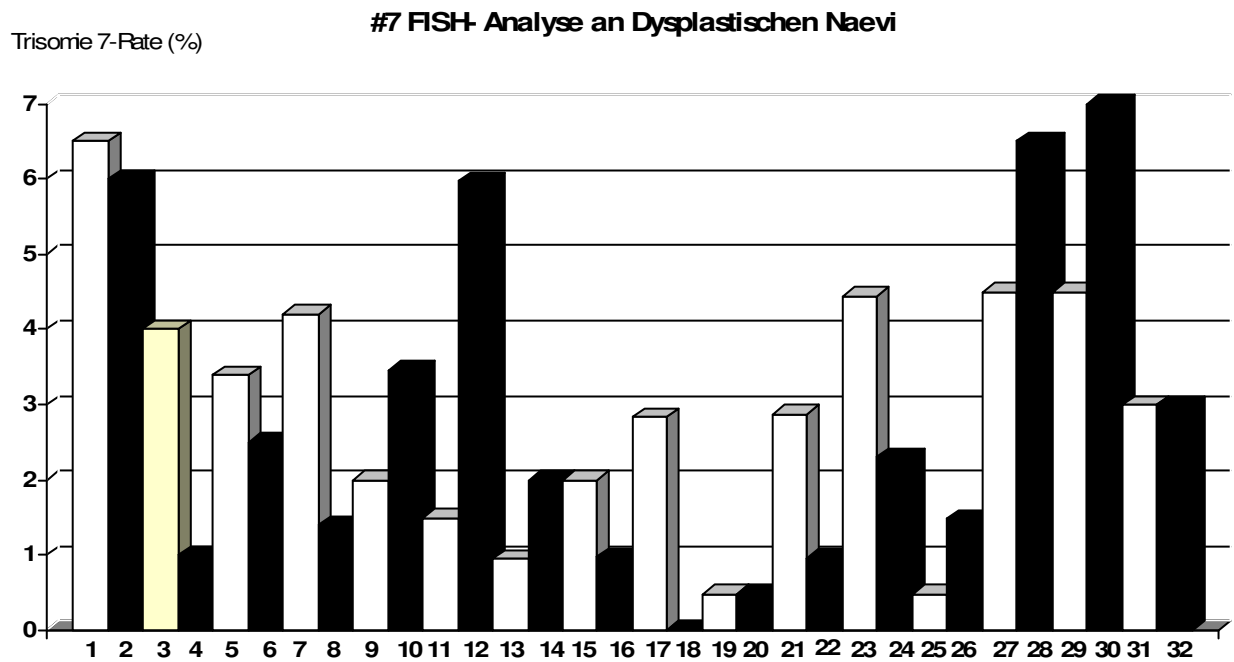
Diagramm 4



**Abb. 5**

Simultane Darstellung von #7 (Cy3-markiert, rot) und #12 (FITC-markiert, grün) am dysplastischen Naevus-Gewebeschnitt. Es liegen Beispiele von Kernen mit Disomie 7(→) (40er Objektiv).

In 21 von 32 Fällen (65,6%) zeigte sich wie in dem Diagramm 5 bei der Auswertung mit einer mehr als 2%-ige Häufigkeit 3 FISH- Signale für Chr.7 (Trisomie 7). Von 21 Fällen hatten 11 Gewebeproben zwischen 2-4% 3 FISH- Signale für Chr.7 (Trisomie 7). Die restlichen 10 Fälle von 21 Fällen hatten zwischen 4-7% 3 FISH- Signale für Chr.7 (Trisomie 7). Fall 30 hat den höchsten Prozentsatz für das Chr.7-Signal und Fall 18 zeigte kein Signal. In 3 von 32 Fällen (ca.3%) zeigten die Zellkerne 3 Chr.12-Signale, Fall 1 hatte höchste Trisomie 12-Rate mit 3%, Fall 3 und Fall 4 hatten jeweils 2%. Hier gab es keinen relevanten Ausreißer, so dass eine Modifikation an dem FISH-Protokoll nicht erforderlich war.



Dysplastische Naevi (n =32)

Diagramm 5

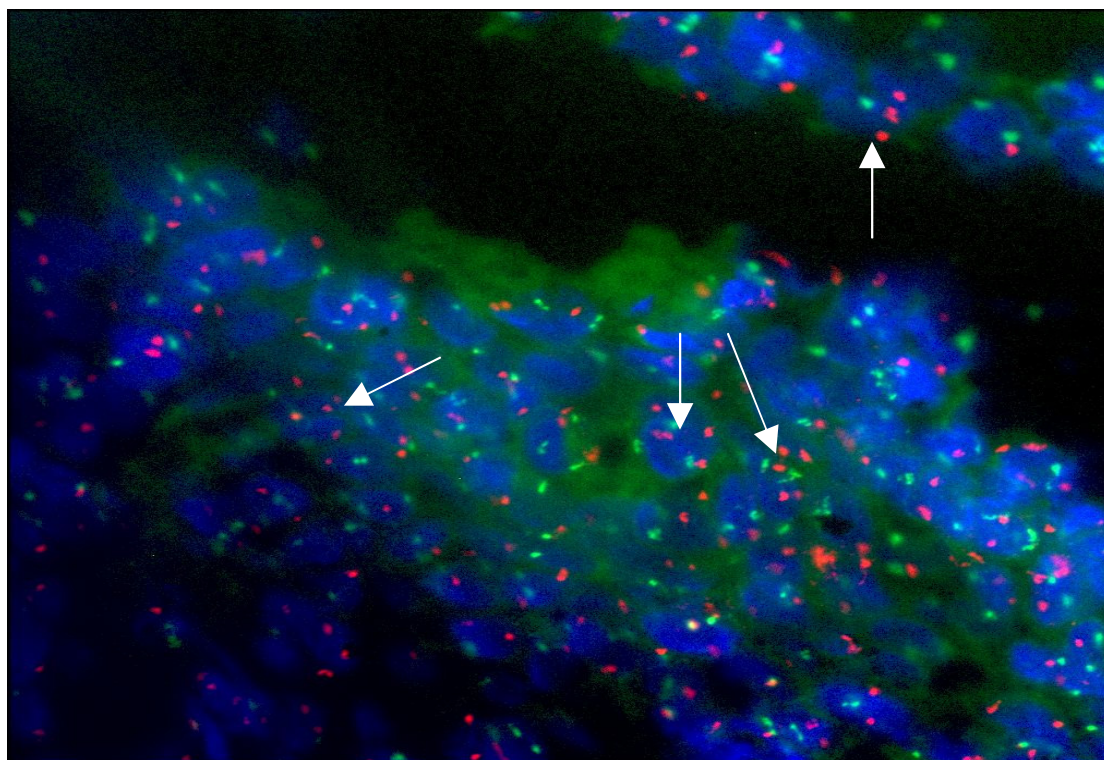
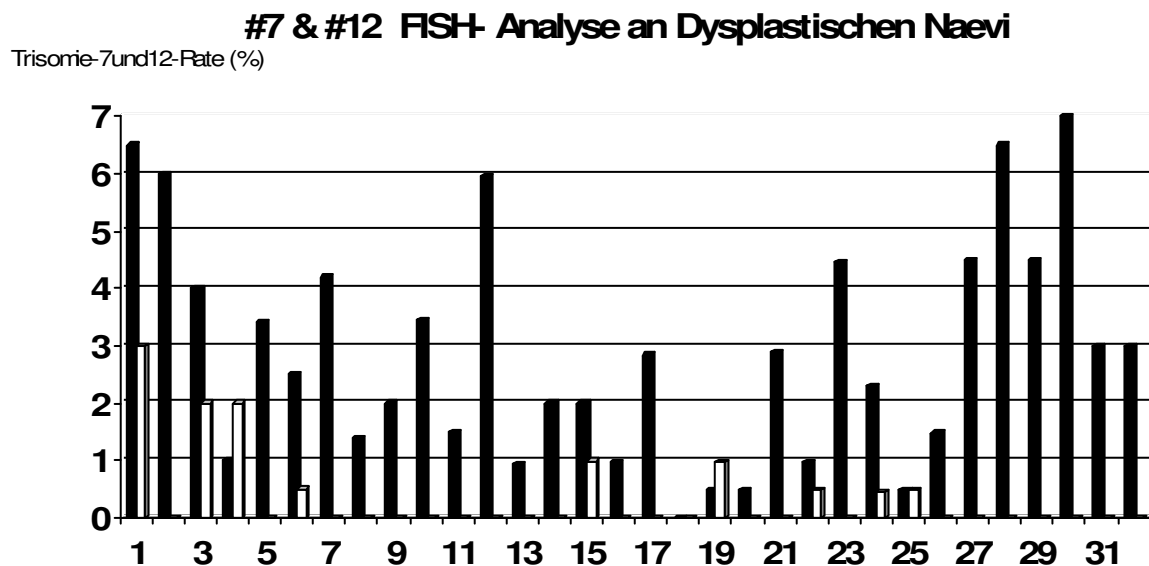


Abb. 6

Simultane Darstellung von #7 (Cy3-markiert, rot) und #12 (FITC-markiert, grün) am dysplastischen Naevus-Gewebeschnitt. Es liegen Beispiele von Kernen mit Trisomie 7(→) (40er Objektiv).

Neben 21 Gewebeproben mit Trisomie 7 gab es auch in drei Gewebeproben Trisomie 12 für Kontrollchromosom. Fallnummer 1 hatte 3%, Fallnummer 3 und -4 hatten 2% Trisomie 12-Rate (siehe Diagramm 6).



**Diagramm 6**

**Trisomie-Rate für Chr.7 und Kontrollchromosom (Chr.12)**

### **4.3. Informationen zu den einzelnen Präparaten**

Die abschließenden Auswertungen zeigten, dass nicht alle Gewebeproben ein relevantes FISH- Signal für Chr.7 bzw. Trisomie aufweisen. Liegt das Signal unter 2% (Cut off Level), ist das Signal als nicht signifikant zu werten. Darüber hinaus wurden die histologischen Besonderheiten der jeweiligen Naevus-Präparate, die eine relevante Trisomie 7 aufweisen, hinsichtlich einer Tendenz zur malignen Entartung analysiert

### Gewebeproben mit Fallnummern

1-181/06**	8-113/06	15-939/06*	22-2139/02	29-3137/06**
2-4279/06**	9-2239/06*	16-562/04	23-623/05**	30-3543/04**
3-3195/06**	10-2279/06*	17-1737/04*	24-1403/05*	31-797/04*
4-3225/06	11-2008/06	18-2641/02	25-1289/05	32-2851/02*
5-3141/06*	12-1115/06**	19-1678/03	26-367/05	
6-2401/06*	13-187/06	20-2138/02	27-892/05**	
7-1793/06 **	14-138/06*	21-1945/04*	28-2639/02**	

- \* : 2-4% → 3 FISH-Signale für Chr. 7 ( Trisomie 7)
- \*\* : 4%< → 3 FISH-Signale für Chr. 7 (Trisomie 7)

Bei den 20 dysplastischen Compoundnaevi hatten 7 Gewebeproben durchschnittlich mehr als 4% Trisomie 7-Rate, 6 Gewebeproben hatten durchschnittlich zw. 2-4% Trisomie 7-Rate und 7 Gewebeproben zeigten keine relevante Trisomie 7-Rate.

Bei den 7 dysplastischen Junktionsnaevi hatte 1 Gewebeprobe mit 7% die höchste Trisomie 7-Rate, 3 Gewebeproben zeigten durchschnittlich zw. 2-4% Trisomie 7-Rate und 3 Gewebeproben hatten keine relevante Trisomie 7-Rate.

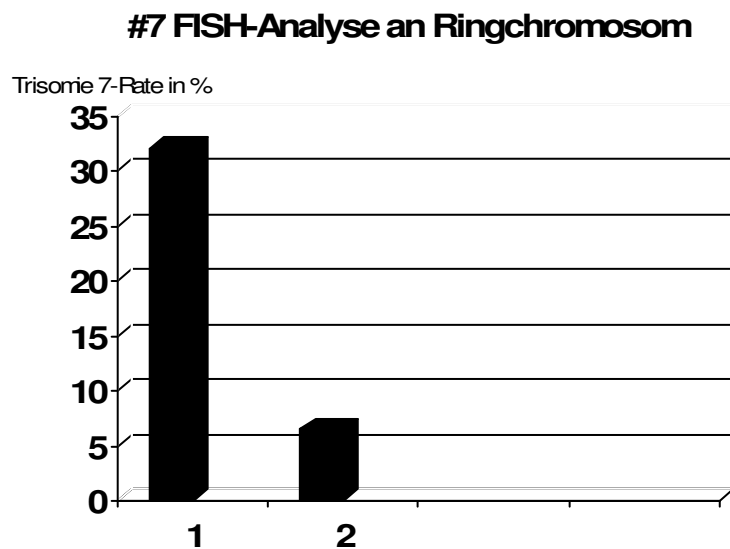
Bei den 4 dysplastischen Naevi mit Regression hatte 1 Gewebeprobe 4,5% Trisomie 7-Rate, 2 Gewebeproben hatten durchschnittlich zw. 2-4% Trisomie 7-Rate und eine Gewebeprobe zeigte keine relevante Trisomie 7-Rate.

Eine seborrhoische Keratose vom retikulären Typ (Basalzellpapillom) zeigte 4% Trisomie 7-Rate.

Somit hat sich an den untersuchten Geweben herausgestellt, dass 65% der dysplastischen Compoundnaevi, 57% der dysplastischen Junctionsnaevi und 75% der dysplastischen Naevi mit Regression eine relevante Trisomie 7 zeigten.

#### **4.4. Vergleichung der beiden Studien für Ringchromosom-Patienten**

Bei der Voruntersuchung des stark proliferativen Naevus bei Ringchromosom 7 wurde die Trisomie 7-Rate mit 32,1% ermittelt. Dieser Wert lässt bei Gewebeschnittpräparaten das Vorliegen einer sehr hochprozentigen Trisomie (schätzungsweise > 70%) im Ausgangsgewebe annehmen. Bei der Analyse des in der Folgestudie erfassten zweiten Naevus (Fall 1) wurde eine vergleichsweise deutlich geringere Trisomie 7-Rate von 6,5% (siehe Diagramm 7) festgestellt. Obgleich sich die ausgeprägte Auffälligkeit bei dem zweiten Naevus nicht in gleichem Ausmaß bestätigte, wurde auch hier eine relevante Trisomie 7-Rate von über 2% (Cut off Level) dargestellt.



**Diagramm 7**

**Trisomie 7-Rate bei Ringchromosom-Patienten in beiden Studien**

## 5. Diskussion

Klinisch atypische oder -nach alter Nomenklatur -dysplastische Naevi zeigen eine erhöhte Tendenz zur Entartung mit Übergang zum malignen Melanom. Eine prämaligne genetische Veränderung auch bereits in Naevuszellen entsprechender atypischer Naevi erscheint daher möglich. Beim malignen Melanom wurden verschiedene zytogenetische Aberrationen, darunter auch das Auftreten von Zellen mit Trisomie 7 beschrieben.

### **5.1. Mosaik-Trisomie 7 in einem hochgradig proliferativen atypischen Naevuszellnaevus bei konstitutionellem Ringchromosom 7**

Bei der FISH-Analyse eines hochgradig proliferativen atypischen Naevuszellnaevi in einem Indexpatienten mit konstitutionellem Ringchromosom 7 (46,XY, r(7); zytogenetisch scheinbar kompletter Chromosom 7-Ring) konnten wir demonstrieren, dass selektiv in den Naevuszellen des klinisch suspekten Naevus eine auffällige Vermehrung von Chromosom 7 mit überwiegend 3, aber auch 4 und 5 Kopien vorlag. Aufgrund der Analyse trunkierter Zellen im Gewebeschnitt repräsentieren die FISH-Signale dabei nicht direkt den realen zellulären Chromosomengehalt. Das in unserer Analyse ermittelte Verteilungsmuster von FISH-Signalen entspricht dem einer nahezu durchgängigen Trisomie mit kleineren Anteilen höhergradiger 7-Polysomie. Für Ringchromosomen ist als generelles Phänomen eine somatische Instabilität durchaus bekannt; hierbei können grundsätzlich Verluste oder auch Gewinne bzw. Verdopplung im Sinne von Doppelringen beobachtet werden. Auffällig an unserem Patienten war, dass ein Gewinn von Chromosom 7 (vermutlich aufgrund der Ringkonstitution) im Blut trotz ausgeweiteter konventionell zytogenetischer und FISH-Analyse (mit Chromosom 7-Zentromer-Sonde) und in begleitend untersuchten Epidermiszellen nicht in gleicher Weise gefunden wurden. Umgekehrt wurde an Blutzellen des Patienten die vermehrte Ausschleusung (Mikrokerne mit Chromosom 7-Material) bzw. der Verlust eines Chromosoms 7 beobachtet.

In der Literatur wurden bislang 14 Patienten mit einem konstitutionellen großen Ringchromosom 7 beschrieben; mit Ausnahme eines einzigen Falles war bei allen

Patienten unter anderem eine auffällige Tendenz zur Naevusbildung evident. An einem Patienten wurde das Auftreten eines malignen Melanoms berichtet.

Ausgehend von unseren Befunden wäre als Ursache der Lentiginose die kausale Induktion durch gewebespezifische Vermehrung von Chromosom 7 zu erwägen, die speziell in den Naevuszellen zu einer verstärkten Proliferation führt. Das Chromosom 7 beherbergt etliche Gene für Wachstumsfaktoren, die an der Zellproliferation beteiligt sind (z.B. EGFR, HGF); in der Zellkultur wurde in diesem Sinne bei Trisomie 7 eine erhöhte DNA-Synthese-Rate und eine verstärkte Proliferation beschrieben.

Andererseits darf nicht unerwähnt bleiben, dass im Rahmen der Ringbildung auch bei zytogenetisch scheinbar intakten Chromosomen häufig submikroskopische Verluste genhaltiger DNA vorliegen, die aufgrund der resultierenden Haploinsuffizienz zu einer monogen bedingten Symptomatik führen können. In Bezug auf das konstitutionelle Ringchromosom 7 kommt daher auch ein Chromosom 7-ständiges Gen infrage, was bei terminalem DNA-Verlust im Bereich der Ringfusion zu der auffälligen Lentiginose führen könnte. Ein entsprechendes Kandidatengen wurde bisher allerdings noch nicht identifiziert.

## **5.2. Mosaik-Trisomie 7 in 32 atypischen Naevi**

Um eine allgemeine Bedeutung einer Trisomie 7 als kausale proliferationsfördernde (ggf. prämaligne) zytogenetische Veränderung in atypischen Naevi im Hinblick auf die Melanomgenese zu überprüfen, führten wir eine erweiterte molekularzytogenetische Studie an 31 atypischen/ dysplastischen Naevuszellnaevi unabhängiger Individuen durch. Zusätzlich wurde ein weiterer exzidiert atypischer Naevus des Ring-7-Patienten eingeschlossen.

Durch FISH-Analyse mit einer Chromosom 7-Zentromer-Sonde an formalinfixierten Gewebeschnitten konnten wir darstellen, dass tatsächlich in über der Hälfte der Fälle (21 von 32; 65,6%) eine relevante Trisomie 7 (>2%) vorlag. Die mittlere Trisomie Rate wurde bei diesen Fällen mit 3,95% (2%-7%) ermittelt. Bei detaillierter Analyse fand sich hierbei überwiegend eine relativ geringe Rate von 7-trisomen Zellen: Eine Trisomie-Rate von 2-4% fand sich in 11 Fällen (34,3%), eine Trisomie-Rate 4-7% in



10 Fällen (31,2%). In keiner weiteren Gewebeprobe wurde ein vergleichbar hoher Prozentsatz von Trisomie 7-Zellen gefunden wie bei dem o. g. Indexfall. Bei Analyse des zweiten Naevus des Ring-7-Patienten wurde ebenfalls eine Mosaik-Trisomie 7- jedoch auch hier in vergleichsweise deutlich geringerem Anteil von 6,5% gefunden. Bei diesem Naevus wurde klinisch und histologisch allerdings eine weit geringere proliferative Aktivität beschrieben.

Die durchschnittliche Trisomie 7-Rate aller Fälle lag in Anbetracht der negativen Fälle (Trisomie-Raten  $<2\%$ ) bei 2,9% (0%-7%). Die dargestellten Befunde belegen, dass eine Mosaik-Trisomie 7 in mehr als 2/3 der klinisch atypischen und exzisionswürdigen Naevuszellnaevi vorkommt und somit hier kein seltenes Ausnahme-Phänomen darstellt. Die absolute Rate an 7-trisomen Zellen wurde allerdings in einem vergleichsweise niedrigen Prozentsatz ermittelt (differenzierte Betrachtung aus methodischer Sicht siehe unten), was die endgültige Bewertung erschwert. Der höchste Wert wurde eindeutig im Ausgangsfall des Ringchromosom-7-Patienten gefunden; hier könnte die Ringchromosom-Konstitution zu dem gehäuften Auftreten des Phänomens beigetragen haben. Interessant ist allerdings, dass dieser Naevus eine ausgeprägte proliferative Tendenz zeigte und klinisch differentialdiagnostisch den starken Verdacht auf das Vorliegen eines Melanoms erweckte. Die Zweitanalyse eines anderen Naevus desselben Patienten, der klinisch und histomorphologisch weitaus weniger proliferative Aktivität aufwies, zeigte eine vergleichbar deutlich geringere Trisomie 7-Rate. Dies könnte auf eine proliferationsassoziierte Bedeutung einer Mosaik-Trisomie 7 in Naevuszellnaevi hinweisen. Abgesehen von dem einzelstehenden Indexfall, der sicherlich aufgrund seiner genetischen Besonderheit wie auch der ausgeprägten klinischen Auffälligkeit eine Sonderstellung einnimmt, konnte an den übrigen Naevi keine klare Korrelation zwischen Mosaik-Trisomie 7- Rate und Histomorphologie bzw. Klinik ermittelt werden. Anlass hierfür waren im Wesentlichen die relativ geringen Unterschiede der FISH-Analyse und beschränkte Dateninformation zu klinischen Aspekten der exzidierten Naevi (retrospektive Materialgewinnung).

### **5.3. Methodische Aspekte**

In Anbetracht der indirekten Nachweismethode muss bei der FISH-Analyse ein methodischer Bias aufgrund von Signalfehlinterpretation berücksichtigt werden; bei Analyse von Blutlymphozyten mit Zentromer-spezifischen Chromosomensonden wurde hierfür ein sog. Cut-off-Level von 2% für eine „relevante“ Signalvermehrung = Chromosomengewinn definiert. Dieser Wert wurde auch für die hier ermittelten FISH-Daten zur Bewertung zugrunde gelegt.

Die FISH-Analyse an formalinfixierten Gewebeschnitten ist methodisch diffizil und als indirekte Nachweismethode zudem fehleranfällig. Gerade aufgrund variabler individueller Faktoren (z.B. Bindegewebsanteil, Fasergehalt, Fettgehalt, Zelldichte usw.) bzw. präparationsbedingten Aspekten (Dauer der Formalinfixierung, gepuffertes- versus ungepuffertes Formalin u.a.) schwankt die Hybridisierungseffizienz zwischen einzelnen Analysen. Bei Bestimmung eines fraglichen Zugewinnes an Chromosomen kann durch eine reduzierte eine falsch negative Bestimmung bzw. Unterschätzung des realen Mosaikanteils bewirken. Um dies zu vermeiden bzw. zu minimieren wurde hier eine Kohybridisierung mit einer zweiten Sonde als interne Kontrolle der Hybridisierungseffizienz eingesetzt. Bei den Fällen mit hohem Anteil (>30%) von Zellen mit 0 oder 1 Hybridisierungssignal für die Testsonde wurde bei vermuteter mangelhafter Hybridisierungseffizienz eine Wiederholung der FISH-Analyse mit einem intensivierten Präparationsprotokoll durchgeführt. Hiermit konnte eine Erhöhung der Hybridisierungseffizienz erzielt werden. Letztlich konnte jedoch nicht in allen Fällen die erwünschte hohe Effizienz der Markierung erzielt werden, so dass eine zahlenmäßige Unterschätzung des Phänomens der Mosaik-Trisomie 7 im Einzelfall möglich ist.

Wesentlich ist auch die Betrachtung der erhobenen Befunde unter dem Aspekt der Analyse an Gewebeschnitten. Durch die Trunkierung von Kernen im Rahmen des Schneidevorgangs kommt es bei Gewebeschnitten zu Verlust von Zellkernanteilen (und damit DNA), die oberhalb bzw. unterhalb der Schnittebene gelegen waren. Daher ist – auch bei optimaler Hybridisierungseffizienz- mit einem gegenüber dem

ursprünglichen zellulären Chromosomengehalt reduzierten Signalgehalt der FISH-Analyse zu rechnen. Das Ergebnis der Analyse spiegelt sich in typischen Signalverteilungsmustern wieder, die nach Erfahrungswerten repräsentativ für bestimmte numerische Chromosomenkonstitutionen sind.

Auch bei durchgängiger Trisomie eines Chromosoms wären hier anteilig (je nach Zellkerndurchmesser und Schnittdicke variabel) Trisomie-Raten von ca. 35-40% realistisch.

Auch bei den durch uns erhobenen Trisomie 7-Raten an Gewebeschnitten von Naevuszellnaevi ist demnach ein real höherer Anteil 7-trisomer Zellen zugrunde zulegen.

#### **5.4. Bedeutung der Trisomie 7 in Naevuszellen**

Die Wertigkeit der Mosaik-Trisomie 7 ist bisher nicht eindeutig geklärt. Eine Trisomie 7 wurde bislang in einer Reihe maligner Tumoren als charakteristische Veränderung beschrieben (z.B. Hirntumore, z.B. Nierenkarzinom); weiterhin konnte bei einigen chronisch entzündlichen Erkrankungen oder z.T. in scheinbar normalen Gewebezellen das Vorkommen von Mosaik-Trisomie 7 beobachtet werden. Auch im Melanom wurde u.a. Trisomie 7 als zytogenetische Auffälligkeit beschrieben. Unsere Befunde weisen darauf hin, dass in einem nicht unbeträchtlichen Anteil der dysplastischen Naevi eine Mosaik-Trisomie 7 vorliegt. Diese könnte eine verstärkte Wachstumstendenz vermitteln, die als prämalignes Phänomen einer malignen Entartung zum Melanom Vorschub leisten könnte. Speziell die Einzelfallbeobachtung der analysierten Naevi des Ring-7-Patienten legt eine proliferationsassoziierte Bedeutung nahe. Andererseits ist letztlich auch die zufällige Akkumulation einer Trisomie-7 aufgrund der Ring-Konstellation möglich.

Aus Zellkulturstudien (Trisomie 7-Abortgewebe) bzw. bei rheumatischer Synovia, wo eine Mosaik-Trisomie 7 häufig vorkommt, wurden jedoch ein selektiver Wachstumsvorteil von Zellen mit Trisomie 7 ebenso wie eine erhöhte DNA-Syntheserate berichtet. Das Chromosom 7 beherbergt etliche Wachstumsfaktor- bzw. -Rezeptorgene, die an der zellulären Proliferation beteiligt sind. Eine Kopienzahlerhöhung könnte zu einer entsprechend vermehrten Genexpression führen.

Da die Erfordernisse spezieller Zelltypen sehr unterschiedlich sind, ist es durchaus plausibel, dass bestimmte Zelltypen bzw. Gewebe durch eine so veränderte genetische Konstitution in unterschiedlicher Weise (positiv oder negativ) beeinflusst werden können. Ein gewebespezifischer Wachstumsvorteil z.B. für Naevuszellen ist durchaus möglich.

Auf eine mögliche Zelltyp- bzw. gewebespezifische Bedeutung weist u.a. auch die Beobachtung hin, dass eine Trisomie 7 in Blutzellen -entgegen etlichen anderen Geweben – generell nicht beschrieben wird, wohingegen eine Monosomie 7 im Blut z.B. im Rahmen eines myelodysplastischen Syndroms durchaus als charakteristisches zytogenetisches Phänomen vorkommt. Unter der Annahme einer mitotischen Fehlverteilung als Ursache von Tri- und Monosomie 7 wäre jeweils ein kombiniertes Auftreten beider Auffälligkeiten zu erwarten. Die selektive Beobachtung jeweils nur eines der beiden Phänomene ließe sich durch einen starken selektiven Vorteil oder umgekehrt eine negative Selektion der unterschiedlichen zytogenetischen Konstitution in entsprechenden Geweben erklären. Eine negative Selektion der Trisomie 7 scheint in Naevuszellen ausgehend von unseren Befunden nicht vorzuliegen; eine evtl. sogar proliferationsfördernde Wirkung des Chromosom 7-Gewinnes erscheint in Anbetracht der hochgradig gesteigerten mitotischen Aktivität und proliferativen Tendenz des primär analysierten dysplastischen Naevus unseres Indexpatienten durchaus plausibel. Da keine Daten zu normalen (klinisch unverdächtigen) melanozytären Naevi vorliegen, lassen die erhobenen Befunde von Mosaik-Trisomie 7 bei unserer Studie klinisch atypischer und histologisch dysplastischer Naevi keine eindeutige Aussage zu einer progressionsfördernden oder prä malignen Bedeutung zu.

Weiterführende Untersuchungen sollten das Vorkommen der Auffälligkeit auch in nicht-dysplastischen Naevi überprüfen. Es ist jedoch zu bemerken, dass auch ein klinisch unauffälliger Naevus das Resultat einer lokalen Proliferation von Naevuszellen darstellt. Eine Mosaik-Trisomie 7 auch in diesen Zellen schliesse somit eine Wachstums-assoziierte Bedeutung der Trisomie 7 für Naevuszellen nicht aus. Von weiterführendem Interesse wäre sicherlich die Beantwortung der Frage, ob sich die im Einzelfall angedeutete Korrelation hoher Trisomie 7-Raten und hochproliferativer Klinik bestätigen lassen. Hierzu wäre eine prospektive

Untersuchung melanozytärer Naevi mit Berücksichtigung der anamnestisch beobachteten Entwicklungsdynamik, der klinisch-morphologischen Untersuchung mittels Dermatoskopie sowie der Histopathologie und molekulargenetischen Analyse angezeigt.

**6. Literaturverzeichnis**

1. Ackerman AB.: Critical commentary on statements in ‘Precursors to Malignant Melanoma’. Am J Dermatopathol. 1984 Summer; 6 Suppl: 181-3.
2. Ackerman AB., Roth ME, Grant-Kels JM, Elder DE, Friedman RJ, Heilman ER, Maize JC, Sagebiel RW.: The histopathology of dysplastich nevi. Continued controversy. Am J Dermatopathol. 1991 Feb;13(1):38-51. Review.
3. Amalfitano G, Chatel M, Paquis P, Michiels JF.: Fluorescence in situ hybridization study of aneuploidy of chromosomes 7, 10, X and Y in primary and secondary glioblastomas. Cancer Genet Cytogenet. 2000 Jan 1;116(1):6-9.
4. Armstrong,B.K., Kricker A. & English D.R. : Sun exposure and skin cancer. Australas. J. Dermatol. 38 Suppl 1, S1-S6(1997).
5. Armstrong,B.K., Kricker A. & English D.R. : The epidemiology of UV induced skin cancer. J.Photochem. Photobiol. B 63, 8-18(2001).
6. Bale SJ, Dracopoli NC, Tucker MA et al.: Mapping the gene for hereditary cutaneous malignant melanoma-dysplastic nevus to chromosome 1p. N Engl J Med 1989; 320: 1367-1372.
7. Bataille V., Grulich A., Sasieni P., Swerdlow A., Newton Bishop J., McCarthy W., Hersey P., Cuzick J. The association between naevi and melanoma in poplations with different levels of sun exposure: ajoint casecontrol study of melanoma in the UK and Australia. Br J Cancer 1998; 77:505-510.
8. Bauman JGH, Wiegant J, Borst P, van Duijin (1980): A new method for fluorescence microcopial localization of specific DNA sequences by in situ hybridisation of fluorochrome-labelled RNA. Exp Cell Res 128:485-490.

9. Berrozpe G, Miro R, Caballin MR, Salvador J, Egozcue J.: Trisomy 7 may be a primary change in noninvasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Genet Cytogenet.* 1990 Nov 1;50(1):9-14.
10. Böni R., Burg G. [The atypical nevus: a risk situation?] *SchweizMed Wochenschr.* 1999 Jun 5;129(22):825-32.Review.German.
11. Böni R, Dummer R.: Entwicklung zahlreicher melanozytärer Naevuszellnaevi unter Immunsuppression. *Zbl Haut* 1995;70:1-2.
12. Breuninger H, Köhler C, Drepper H, Bastian B, Bröcker EB, Göhl J, Groth W, Hermanek P, Hohenberger W, Lippold A, et al.: Is acrolentiginous melanoma (ALM) more malignant than superficially spreading melanoma (SSM) at a high-risk site? A matched-pair comparison between 113 ALM and SSM within the scope of a multicenter study. *Hautarzt.*1994 Aug;45(8):529-31.
13. Broberg K, Toksvig-Larsen S, Lindstrand A, Mertens F.: Trisomy 7 accumulates with age in solid tumors and non-neoplastic synovia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001 Mar;30(3):310-5.
14. Bullerdiek J, Leuschner E, Taquia E, BonkU, Bartnitzke S: Trisomy 8 as a recurrent clonal abnormality in breast cancer? *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 65:64-67.
15. Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Wright EC et al.: Evidence against the reported linkage of the cutaneous melanoma-dysplastic nevus syndrome locus to chromosome 1p36. *Am J Hum Genet* 1990; 46:912-918.
16. Carey WPJ, Thompson CJ, Synnestvedt M, Guerry D, Halpern A, Schultz D, Elder DE (1994): Dysplastic nevi as a melanoma risk factor in patients with familial melanoma. *Cancer* 74: 3118-3125.

17. Celeda D., Bettag U., Cremer C.: A simplified combination of DNA probe preparation and fluorescence in situ hybridization. *Zeitschrift für Naturforschung*, Vol. 12, Nr1(1992).
18. Clark WHJ, Reimer RR, Greene M., Ainsworth AM, Mastrangelo MJ (1978) Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. 'The B-K mole syndrome'. *Arch Dermatol* 114: 732-738.
19. Cox KH, Deleon DV, Angerer LM, Angerer RC (1984): Detection of mRNAs in sea urchin embryos by in situ hybridisation using asymmetric RNA probes. *Dev Biol* 101:485-502.
20. Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L.: Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet.* 1988 Nov;80(3):235-46.
21. Crijns MB, Vink J, Van Hees CL, Bergman W, Vermeer BJ.: Dysplastic nevi: occurrence in first- and second-degree relatives of patients with 'sporadic' dysplastic nevus syndrome. *Arch Dermatol* 1991;127:1346-51.
22. Crutcher WA, Kelly JW, Sagebiel RW.: Clinical diagnosis of dysplastic melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1986;14:1044-52.
23. Dal Cin P, De Smet L, Sciote R, Van Damme B, Van den Berghe H.: Trisomy 7 and trisomy 8 in dividing and non-dividing tumor cells in Dupuytren's disease. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999 Jan 15;108(2):137-40.
24. Du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H, Kowacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T (1993): Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridisation. *Hum Genet* 90:590-610.



25. Dubinsky R, Amiel A, Manor Y, Radnay Y, Fejgin M, Ravid M, Lishner M.: Fluorescence in situ hybridization (FISH) for retrospective detection of trisomies 3 and 7 in multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1995 Sep;83(2):115-8.
26. Dummer R., Nestle FO, Burg G. New Perspectives on immunobiology and immunotherapy of melanom. *Immunology Today* 1999 (in press), Schweiz Med. Wochenschr. 1999;129: 46-8.
27. Durm M.: Quantitative Studien zur Weiterentwicklung und Beschleunigung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung von Chromosomen in Metaphaseplatten und Interphasezellkernen. Inauguraldisserrrtation Universität Heidelber (1996).
28. Easton DF, Cox GM, Macdonald AM, Ponder BA.: Genetic susceptibility to naevi- a twin study. *Br J Cancer* 1991;64:1164-7.
29. Elfving P, Lundgren R, Cigudosa JC, Heim S, Mandahl N, Mitelman F.: Trisomy 7 in nonneoplastic kidney tissue cultured with and without epidermal growth factor. *Cancer Genet Cytogenet* 1992 Nov;64(1):99-100.
30. Ermis A, Hopf T, Hanselmann R, Remberger K, Welter C, Dooley S, Zang KD, Henn W.: Clonal chromosome aberrations in cell cultures of synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Genes Chromosomes Cancer.* 1993 Apr;6(4):232-4.
31. Fletcher JA, Henkle C, Atkins L, Rosenberg AE, Morton CC.: Trisomy 5 and trisomy 7 are nonrandom aberrations in pigmented villonodular synovitis: confirmation of trisomy 7 in uncultured cells. *Genes Chromosomes Cancer.* 1992 Apr;4(3):264-6.
32. Friedman RJ, Heilman ER, Rigel DS, Kopf AW.: The dysplatic nevus: clinical and pathological features. *Dermatol Clin* 1985;3:239-49.

33. Gall, J.G., Pardue, M.L. (1969).: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63: 378-383.
34. Gandini,S. et al.: Meta—analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur. J. Cancer* 41, 28-44(2005).
35. Gandini,S. et al.: Meta—analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II: Sun exposure. *Eur. J. Cancer* 41, 45-60 (2005).
36. Gandini,S. et al.: Meta—analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III: Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur. J. Cancer* 41, 2040-2059(2005).
37. Garbe C., Tronnier M., Bröcker EB, Stadler R., Steinkraus V., Soyer HP, Wolff HH. [Standards in histopathologic diagnosis of malignant melanomas. Recommendations of the Working Group of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatologic Society] *Hautarzt*: 1997 Oct;48(10):720-9.Review.German.
38. Gburek BM, Kollmorgen TA, Qian J, D’Souza-Gburek SM, Lieber MM, Jenkins RB.: Chromosomal anomalies in stage D1 prostate adenocarcinoma primary tumors and lymph node metastases detected by fluorescence in situ hybridization. *J Urol*. 1997 Jan; 157(1):223-7.
39. Goldstein AM, Dracopoli NC, Engelstein M et al.: Linkage of cutaneous malignant melanoma/dysplastic nevi to chromosome 9p, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1994; 54:489-496.
40. Goldstein AM, Dracopoli NC, Ho EC et al.: Frurther evidence for a locus for cutaneous malignant melanoma-dysplastic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 537-550.

41. Green A, Swerdlow AJ.: Epidemiology of melanocytic nevi. *Epidemiol Rev* 1989;11:204-21.
42. Grob JJ, Bastuji-Garin S, Vaillant L, Roujeau JC, Bernard P, Sasasolas B, et al.: Excess of nevi related to immunodeficiency : a study in HIV-infected patients and renal transplant recipients. *J Invest Dermatol* 1996;107:694-7.
43. Gruis NA, Sandkuijl LA, Werber JL et al. : Linkage analysis in Dutch familial atypical multiple mole-melanoma (Fammm) syndrome families. Effect of naevus count. *Melanoma Res* 1993; 3:271-277.
44. Haar F.-M., Durm M., Hausmann M., Ludwig H., Cremer C.: A rapid FISH technique for quantitative microscopy. *Bio Techniques*, Vol 17, Nr.2, S.346-353,(1994).
45. Hammer H, Olah J, Toth-Molnar E.: Dysplastic nevi are a risk factor for uveal melanoma. *Eur J Ophthalmol* 1996;6:472-4.
46. Happle R.: Gregor Mendel und di dysplastischen Naevi. *Hautarzt* 1989;40:70-6.
47. Harper ME, Saunders GF (1981): Localisation of single copy DANN sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridisation. *Chromosoma* 83:431-439.
48. Harth Y., Friedman-Birnbaum R., Linn S.. The influence of cumulative sun exposure on the prevalence of common acquired nevi. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27:21-24.
49. Hasle H, Olsen JH, Hansen J, Friedrich U, Tommerup N.: Occurrence of cancer in a cohort of 183 persons with constitutional chromosome 7 abnormalities. *Cancer Genet Cytogenet.* 1998 Aug;105(1):39-42.

50. Heim S, Pandis N, Bardi G, Idvall I, Mandahl N, Mitelman F: Chromosome analysis of 20 breast carcinomas: Cytogenetic multiclonality and karyotypic-pathologic correlations. *Genes Chrom Cancer* 1993; 6:51-57.
51. Herbergs J, de Bruine AP, Marx PT, Vallinga MI, Stockbrügger RW, Ramaekers FC, Arends JW, Hopman AH.: Chromosome aberrations in adenomas of the colon. Proof of trisomy 7 in tumor cells by combined interphase cytogenetics and immunocytochemistry. *Int J Cancer*. 1994 Jun 15;57(6):781-5.
52. Herrmann ME, Lalley PA.: Significance of trisomy 7 in thyroid tumors. *Cancer Genet Cytogenet*. 1992 Jun 15;57(6):781-5.
53. Johansson B, Bardi G, Pandis N, Mandahl N, Bak-Jensen E, Lindström C, Törnqvist A, Frederiksen H, Andrén-Sandberg A, Mitelman F, et al.: Cytogenetic analysis of 52 colorectal carcinomas--non-random aberration pattern and correlation with pathologic parameters. *Int J Cancer*. 1993 Sep 30;55(3):422-8.
54. John, H.A., Brinstiel, M.L., Jones, K.W. (1969).: RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223: 582-857.
55. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D(1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821.
56. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D(1993): Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin Cancer Biol* 4:41-46.

57. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Piper J, Isola J, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy changes in solid tumors. *Genes Chromosom Cancer* 10:231-243.
58. Kayser M, Henderson LB, Kreutzman J, Schreck R, Graham JM Jr.: Blaschkolinear skin pigmentary variation due to trisomy 7 mosaicism. *Am J Med Genet.* 2000 Nov 27;95(3):281-4.
59. Kelly JW, Rivers JK, MacLennan R, Harrison S, Lewis AE, Tate BJ. Sunlight: a major factor associated with the development of melanocytic nevi in Australian schoolchildren. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30:40-48.
60. Kleine AK, Böcker W., Herbst H, Müller-Lantsch N.: Analyse genetischer Aberrationen in testikulären Keimzelltumoren mit Hilfe der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) (2005). Universitätsklinikum Münster Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie.
61. Kinzler KW, Vogelstein B.: Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997;386:761-3.
62. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M (2000): Follow-up of melanocytic skin lesions with digital epiluminescence microscopy: patterns of modifications observed in early melanoma, atypical nevi, and common nevi. *J. Am. Acad. Dermatol* 43:467-476.
63. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M (2002): Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol.* 3:159-165.
64. Kovacs G, Brusa P, De Riese W.: Tissue-specific expression of a constitutional 3;6 translocation : development of multiple bilateral renal-cell carcinomas. *Int J Cancer.* 1989 Mar 15;43(3):422-7.

65. Kotzot D, Balmer D, Baumer A, Chrzanowska K, Hamel BC, Ilvina H, Krajewska-Walasek M, Lurie IW, Otten BJ, Schoenle E, Tariverdian G, Schinzel A.: Maternal uniparental disomy7—review and further delineation of the phenotype. *Eur J Pediatr.* 2000 Dec;159(12):929-30.
66. Kruger S, Stadler R, Garbe C, et al.: Markers and relative risk in a German population for developing malignant melanoma. *Int J Dermatol* 1989;28:517-23.
67. Lee JY, Dong SM, Shin MS, Kim SY, Lee SH, Kang SJ, et al.: Genetic alterations of p16INK4a and p53 genes in sporadic dysplastic nevus. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:667-72.
68. Lemieux, N., Dutrillaux, B., Viegas-Pequignot, E. (1992). : A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet. Cell Genet.* 59: 311-312.
69. Lichter, P., Ward, D.C. (1990).: Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age? *Nature* 345: 93-95.
70. Lichter, P., Boyle, A.A., Cremer, T., Ward, D.C. (1991).: Analysis of genes and chromosomes by nonisotopic in situ hybridization. *Genet. Anal. Techn. Appl.* 8: 24-35.
71. Limon J, Mrózek K, Heim S, Elfving P, Nedoszytko B, Babinska M, Mandahl N, Lundgren R, Mitelman F.: On the significance of trisomy 7 and sex chromosome loss in renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1990 Oct 15;49(2):259-63.
72. Loeper S, Romeike BF, Heckmann N, Jung V, Henn W, Feiden W, Zang KD, Urbschatg S.: Frequent mitotic errors in tumor cells of genetically microheterogeneous glioblastomas. *Cytogenet Cell Genet.* 2001;94(1-2):1-8.

73. Lynch HT, Fusaro RM, Kimberling WJ, et al.: Familial atypical multiple mole melanoma (FAMMM) syndrome: segregation analysis: *J Med Genet* 1983;20:342-4.
74. Marghoob AA, Slade J, Kopf AW, Salopek TG, Rigel DS, Bart RS.: Risk of developing multiple primary cutaneous melanomas in patients with the classic atypical-mole syndrome: a case-control study. *Br J Dermatol* 1996;135:704-11.
75. Marmur J.: Determination of DNA by formamide. *Biochimica Biophysica Acta*, Vol.51, S.32-36 (1961).
76. Matsuta M, Imamura Y, Matsuta M, Sasaki K, Kon S.: Detection of numerical chromosomal aberrations in malignant melanomas using fluorescence in situ hybridization. *J Cutan Pathol*. 1997 Apr;24(4):201-5.
77. Matturri L, Cazzullo A, Truconi P, Roncoroni I, Grana D, Milei J.: Inflammatory cells, apoptosis and Chlamydia pneumoniae infection in atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 2000 Aug;75(1):23-33; discussion 33-5.
78. Mcniel, J.A., Villinave Johnson, C., Carter, K.C., Singer, R.H. and Bentley Lawrence, J. (1991).: Localizing DNA and RNA within nuclei and chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Genet. Anal. Techn. Appl.* 8: 41-58.
79. Mehraein Y, Ehlhardt S, Wagner A, Göttert E, Tilgen W, Zang KD, Dill-Müller D.: Somatic mosaicism of chromosome 7 in a highly proliferating melanocytic congenital naevus in a ring chromosome 7 patient. *Am J Med Genet A*. 2004 Dec 1;131(2):179-85.
80. Naeem R, Donovan K, Corson JM, Fletcher JA.: Fluorescent in situ hybridization assessment of chromosome 7 copy number in uncultured lung and kidney cells. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993 Apr;66(2):100-2.

81. NIH Consensus Development Conference. (1992) Diagnosis and treatment of early melanoma. NIH Consensus Development Conference January 27-29, 1992. Consens Statement 10: 1-25.1971 Aug;68(8):1876-80.
82. Orth G, Jeanteur P, Croissant O.(1971) : Evidence for and localization of vegetative viral DNA replication by autoradiographic detection of RNA-DNA hybrids in sections of tumors induced by Shope papilloma virus. Proc Natl Acad Sci USA.
83. Pandis N, Jin Y, Gorunova L, Petersson C, Bardi G, Idvall I, Johansson B, Ingvar C, Mitelman F, Heim S: Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: Identification of eight karyotypic subgroups. Genes, Chromosom Cancer 1995; 12:173-185.
84. Park WS, Vortmeyer AO, Pack S, Duray PH, Böni R, Guerami AA, et al.: Allelic deletion at chromosome 9p21(p16) and 17p13(p53) in microdissected sporadic dysplastic nevus. Hum Pathol 1998;29:127-30.
85. Pinkel D, Straume T, Gray J (1986): Cytogenetic analysis using qualitative, high sensitivity, fluorescence hybridisation. Proc Natl Acad Sci USA 83:2934-2938.
86. Pylkkänen P, Paetau A, Knuutila S.: Chromosome 7 in glioblastoma tissue. Parenchymal vs. endothelial cell. Cancer Genet Cytogenet. 1995 Oct 1;84(1):73-5.
87. Rákossy Z, Vizkeleti L, Ecsedi S, Vokó Z, Bégány A, Barok M, Krekk Z, Gallai M, Szentirmay Z, Adány R, Balázs M.: EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. Int J Cancer.2007 Oct 15;121(8):1729-37.



88. Roesch A., Burgdorf W., Stolz W., Landthaler M., Vogt T.: Dermatoscopy of "dysplastic nevi": a beacon in diagnostic darkness. *Eur J Dermatol.* 2006 Sep-Oct; 16(5):479-93.
89. Schmidt, E.R.(1992).: Mehrfarbige In-situ-Hybridisierung- ein hilfreiches Verfahren bei der Genlokalisierung. *Mitt. Wiss. Techn.* 10: 80-84.
90. Seykora J, Elder DE.: Dysplastic nevi and other risk markers for melanoma. *Semin Oncol* 1996;23:682-7.
91. Stahl-Maugé C, Hager HD, Schroeder TM.: The problem of partial endoreduplication. *Hum Genet.* 1978 Nov 24;45(1):51-62.
92. Steilen-Gimbel H, Henn W, Kolles H, Moriglane JR, Feiden W, Steudel WI, Zang KD.: Early proliferation enhancement by monosomy 10 and intratumor heterogeneity in malignant human gliomas as revealed by smear preparations from biopsies. *Genes Chromosomes Cancer.* 1996 Jul;16(3):180-4.
93. Taylan H, Kiratli H, Aktas D.: Monosomy 7 mosaicism in metastatic choroidal melanoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007 Aug;177(1):70-2.
94. Trask, B.J.(1991).: Fluorescence in situ hybridization. *Tren. Genet.* 7: 149-154.
95. Tucker MA, Crutcher WA, Hartge P, Sagebiel RW.: Familial and cutaneous features of dysplastic nevi: a case-control study. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:558-64.
96. Tucker MA, Misfeldt D, Coleman CN, et al.: Cutaneous malignant melanoma after Hodgkin's disease. *Ann Intern Med* 1985 ;102 :37-41.

97. Udart M, Utikal J, Krähn GM, Peter RU. : Chromosome 7 aneusomy. A marker for metastatic melanoma? Expression of the epidermal growth factor receptor gene and chromosome 7 aneusomy in nevi, primary malignant melanomas and metastases. *Neoplasia*. 2001 May-Jun;3(3):245-54.
98. Verp MS, Amarose AP.: Chromosomal mosaicism of trisomy 7 restricted to chorionic villi. *Am J Med Genet*. 1987 Sep;28(1):221.
99. Vollenweider Roten S, Delozier-Blanchet CD, Masouyé I, Saurat JH.: Melanoma associated with ring chromosome 7. *Dermatology*. 1993;186(2):138-43.
100. Wahlström J, Bjarnason R, Rosdahl I, Albertsson-Wikland K. : Boy with a ring 7 chromosome : a case report with special reference to dermatological findings. *Acta Paediatr*. 1996 Oct;85(10):1256-6.
101. Wang Y, Rao U, Mascari R, Richards TJ, Panson AJ, Edington HD, et al. : Molecular analysis of melanoma precursor lesions. *Cell Growth Differ* 1996 ;7 :1733-40.
102. Weiß J. et al. : Genetics of Cutaneous Malignant Melanoma: Update and Clinical Implications. *Akt Dermatol* 2002; 28: 123-127.
103. Wiecker T., Luther H., Buettner P., Bauer J., Garbe C.. Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood. *Cancer* 2003; 97:628-638.
104. Yunis E, Ramirez E, Uribe JG.: Full trisomy7 and Potter syndrome. *Hum Genet*. 1980;54(1):13-18.

## 7. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen bedanken, die mich bei Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Hr. Prof. Dr. E. Meese (Direktor der Humangenetik Universitätsklinik des Saarlandes) für die Bereitstellung der Dissertationsgelegenheit und für die Bereitstellung der Geräte und Räumlichkeiten.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Fr. PD Dr. Yasmin Mehraein für die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit. Vielen Dank für die hilfreichen Anregungen und die Engelsgeduld.

Hr. Prof. Dr. W. Tilgen (Direktor der Klinik für Dermatologie Universitätsklinik des Saarlandes) und Fr. Dr. D. Dill-Müller (Direktorin der Hautklinik Lüdenscheid) für die Überlassung der Gewebeschnitte aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie.

Fr. Heike Scharbach, Fr. Dr. Marion Lang, Hr. Dr. Dr. Günther Schneider und Hr. Johannes Schmidt für die Korrekturen im Rahmen meiner Doktorarbeit.

Allen Mitarbeitern des Institutes der Humangenetik für die gute Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima.

Meinen Freunden und Kollegen für ihre Freundschaft, Aufmerksamkeit und moralische Unterstützung.

Meinen Eltern Abdurrahman und Fatma Kaplan und meiner Schwester Günay Eroglu für ihre liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen.

Abschließend sei den vielen ungenannten Patienten gedankt, die durch ihre vertrauensvolle Einwilligung in den sie betreffenden Anteil an der Untersuchung diese Arbeit erst ermöglichten.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name:	Kaplan
Vorname:	Bülent Tayfun
Geburtsdatum:	06.02.1979
Geburtsort:	Adiyaman/ Türkei
Staatsangehörigkeit:	türkisch

### Schulbildung

1985-1990	Yavuz Selim Grundschule in Adiyaman/ Türkei
1990-1993	Gölbasi Mittelschule in Adiyaman/ Türkei Abschluß mit mittlerer Reife
1993-1996	Gölbasi Gymnasium in Adiyaman/ Türkei Abschluß mit Allgemeiner Hochschulreife

### Hochschulbildung

09/1996-11/1996	Universität Van Fakultät für Veterinärmedizin
11/1996	Migration nach Deutschland
1997-2002	Bei Firma HKP und UPS tätig
2001-2002	Studienkolleg an der Universität zu Köln
10/2002	Studiumbeginn der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
03/2005	Ärztliche Vorprüfung
07-09/2006	Famulatur: Kardiologie Intensivmedizin & Notfallmedizin
02-03/2007	Famulatur: Notfallmedizin
08/2007	Famulatur: Kardiologie Intensivmedizin

### Praktisches Jahr:

02/2008-05/2008	Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie Universitätsklinik Homburg/ Saar Unfall- und Wiederherstellungschirurgie Universitätsklinik Homburg/ Saar Neurochirurgie Herz-, Gefäß- und Thoraxchirurgie Universitätsklinik Homburg/ Saar
06/2008	Radiologie Universitätsklinik Homburg/ Saar

---

09/2008                      Innere Medizin ..... Universitätsklinik Homburg/ Saar

**Berufliche Erfahrung:**

2003-2009                      Sitzwache auf der Intensivstation der  
   Universitätsklinik des Saarlandes M3-07 und in der  
   Inneren Notaufnahme CM-01

**Sprachkenntnisse:**

Türkisch und Deutsch